
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Uso do amido de pinhão como agente encapsulante

- Dissertação de Mestrado -

Jordana Corralo Spada

Porto Alegre

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Uso do amido de pinhão como agente encapsulante

Jordana Corralo Spada

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Engenharia.

Orientadores:

Prof^ª. Dr^ª. Ligia Damasceno Ferreira Marczak

Prof^ª. Dr^ª. Isabel Cristina Tessaro

Prof. Dr. Caciano Pelayo Zapata Noreña

Porto Alegre
2011

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Ligia, Isabel e Caciano, por confiarem em mim e por todo apoio, dedicação, incentivo e principalmente amizade durante a orientação deste trabalho. Esses dois anos foram muito enriquecedores para minha formação, muito obrigada!

Aos funcionários do DEQUI, em especial Tatiana, Marcos, Eduardo, Igor e Patrício pelo auxílio e colaboração.

Aos companheiros do LATEPA: Júlia, Giovana, Maurício K., Carolina, Ana, Débora, Voltaire e Maurício por serem muito mais que colegas de trabalho. Obrigada pela amizade tão querida, pelas conversas, e pelo apoio e incentivo. Com vocês tudo foi mais fácil e muito mais agradável. E aos demais amigos do departamento Lara, Cassiano e Rodrigo pela força e por proporcionarem momentos divertidos.

Aos colegas do grupo FENOP pelas sugestões, ideias, boas conversas e momentos agradáveis.

Às bolsistas Aline Luvielmo e Gabriela Damo Sant'Ana pelo auxílio e dedicação durante o trabalho.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de mestrado e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFRGS pela estrutura disponibilizada para realização deste trabalho.

À Dani e Vêro por tantos anos de amizade (tantos, que é melhor nem fazer as contas...rs). É muito bom ser amiga de vocês.

Ao James, por seu amor, carinho, paciência, companheirismo e atenção.

E aos meus pais... não tenho palavras para expressar o quanto amo vocês. Obrigada pelo amor incondicional, por sonharem os meus sonhos e por me incentivarem em todos os momentos.

E a Deus, acima de tudo, por estar sempre ao meu lado.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação Uso do Amido de Pinhão como Agente Encapsulante, elaborada por Jordana Corralo Spada, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Adriano Brandelli

Prof^a. Dr^a. Roberta Cruz Silveira Thys

Prof^a. Dr^a. Renata Platcheck Raffin

Resumo

O β -caroteno corresponde a um pigmento natural que além de possuir amplo poder corante, possui atividade antioxidante e pró-vitamínica, porém devido ao seu alto grau de insaturações, esse carotenóide é propenso à isomerização e oxidação durante o processamento e a estocagem, dificultando sua utilização na indústria de alimentos. A microencapsulação pode amenizar essa situação, aumentando sua estabilidade e tornando possível sua incorporação em sistemas alimentícios sem a perda de suas propriedades funcionais. O presente trabalho objetivou a produção, caracterização e a verificação da estabilidade das cápsulas formadas por liofilização utilizando um novo material de parede, o amido de pinhão. Amido nativo, amido hidrolisado com dextrose equivalente (DE) 6, amido hidrolisado DE 12 e a mistura destes com a gelatina foram utilizados como agentes encapsulantes. Os primeiros testes realizados foram em relação à modificação do amido via hidrólise ácida através de um planejamento fatorial 2^2 , onde as variáveis independentes corresponderam à temperatura (30 a 44°C) e à concentração de ácido (3 a 5 mol.L⁻¹) e a variável de resposta correspondeu à dextrose equivalente (DE). Neste estudo, verificou-se que sob maiores valores de temperatura e concentração de ácido, maiores valores de DE foram encontrados. As cápsulas foram caracterizadas quanto à sua eficiência, conteúdo superficial, morfologia, umidade, solubilidade, tamanho de partícula, temperatura de transição vítrea e isoterma de sorção. As mesmas também foram avaliadas quanto à estabilidade, em relação ao β -caroteno livre, em diferentes condições: exposição à luz UV, e a 10 e 30°C. As diferentes formulações do material encapsulante resultaram em diferentes retenções de β -caroteno, sendo que a formulação com amido DE 12 apresentou a melhor eficiência e a menor foi apresentada pela formulação com amido nativo. As partículas produzidas por liofilização mostraram formas indefinidas e tamanhos variados, típicos do método de encapsulação empregado. Através da análise do tamanho de partícula, verificou-se que as formulações com gelatina apresentaram um diâmetro de partícula médio superior às outras amostras. O amido nativo e hidrolisado apresentaram temperaturas de transição vítrea (T_g) similares resultando em microencapsulados com T_g também similares, porém maiores valores foram obtidos quando a gelatina foi incorporada às formulações. Todas as amostras apresentaram baixa solubilidade em água fria, e uma maior solubilidade em água quente. As isotermas de sorção dos encapsulados preparados com amido DE 12, nas temperaturas de 10°, 20° e 30°C apresentaram isoterma sigmoideal do tipo II. Quanto aos testes de estabilidade, a cinética de degradação do β -caroteno livre e encapsulado seguiu o modelo cinético de primeira ordem em todas as condições analisadas. O amido hidrolisado DE 12 foi considerado o melhor material de parede testado, visto que diminuiu de forma considerável a velocidade de degradação (k), até mesmo na presença da luz UV, onde o β -caroteno foi menos estável. Os resultados encontrados neste estudo demonstraram que o amido de pinhão hidrolisado pode ser considerado um potencial agente encapsulante a ser utilizado na indústria de alimentos.

Palavras-chave: microencapsulação, β -caroteno, amido de pinhão, liofilização, estabilidade.

Abstract

The β -carotene represents a natural pigment that besides having broad coloring power, also presents antioxidant and provitamin activity. However, due to the high degree of insaturations, this dye is propense to isomeration and oxidation during the processing and storage, being difficult its use in food industry. Microencapsulation can improve this situation, increasing its stability and rendering possible its incorporation into food systems without loss of its functional properties. The purpose of this research was to produce, characterize and investigate the stability of the microcapsules produced by freeze drying, using a new wall material corresponding to *pinhão* starch. The β -carotene was microencapsulated using native *pinhão* starch, hydrolyzed *pinhão* starch DE 6, hydrolyzed *pinhão* starch DE 12 and the mixture of both with gelatin, as coating material. First tests were related to the modification of starch via acid hydrolysis using a 2^2 factorial central design, where the independent variables were temperature (from 30 to 44°C) and acid concentration (from 3 to 5 mol.L⁻¹) and the response variable corresponded to dextrose equivalent (DE). In this study, it was observed that higher temperatures and acid concentration, resulted in higher DE values. The capsules efficiency, surface content, moisture, morphology, solubility, particle size, glass transition temperature and sorption isotherms were analyzed. Also the stability of the microencapsulates were evaluated and compared to synthetic free β -carotene at the storage condition: exposure to UV light, and temperatures of 10 and 30 °C. Different coating material formulations resulted in different β -carotene retention, the formulation with hydrolyzed starch 12 DE presented the highest total content of β -carotene (>90 %) and the lowest surface β -carotene while the lowest total content of β -carotene and the highest surface of this compound was presented using native starch. All capsules showed undefined shapes and varied sizes and these characteristics are related to the process used for the preparation of microcapsules. By the particle size distribution analysis, it was verified that encapsulates with gelatin presented an average particle diameter higher than the others encapsulated. Both capsules prepared with native starch and hydrolyzed starch presented similar glass transition temperature, while capsules with gelatin showed higher T_g values (~90°C). All samples presented low cold water solubility and the hot water solubility for all samples was higher than the cold water solubility. The moisture sorption isotherms determined at 10°, 20° and 30°C of hydrolyzed starch DE 12 showed isotherms kind II. The kinetic of degradation of β -carotene in encapsulates followed the first-order model. UV light, the microcapsules were less stable than the in the other conditions. The results indicated that the hydrolyzed *pinhão* starch is a potential encapsulating material.

Keywords: microencapsulation, β -carotene, freeze-drying, *pinhão* starch, stability

SUMÁRIO

Capítulo 1 - Introdução	1
Capítulo 2 - Objetivos	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
Capítulo 3 - Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica	5
3.1 Microencapsulação	5
3.1.1 Histórico.....	5
3.1.2 Princípios e objetivos	6
3.1.3 Técnicas de encapsulação	7
3.1.3.1 Liofilização ou freeze drying	9
3.1.4 Mecanismos de liberação	12
3.1.5 Caracterização das microcápsulas.....	13
3.1.5.1 Temperatura de transição vítrea	14
3.1.5.2 Isotermas de sorção.....	15
3.2 Material formador de parede	18
3.2.1 Amido: estrutura e composição.....	19
3.2.2 Propriedades do amido.....	21
3.2.3 O pinhão como fonte de amido	22
3.2.4 Amidos modificados	25
3.2.5 Amido modificado via hidrólise ácida	26
3.2.6 Uso do amido como agente encapsulante	29
3.2.7 Gelatina	30
3.3 Material de recheio	31
3.3.1 Carotenóides.....	32
3.3.1.1 Estrutura.....	33
3.3.1.2 Estabilidade e degradação	36
3.3.1.3 β - caroteno.....	38
3.3.2 Microencapsulação de carotenóides.....	40
Capítulo 4 - Materiais e Métodos	44
4.1 Matéria-prima e reagentes	44
4.2 Extração do amido de pinhão	45

4.3 Hidrólise do amido de pinhão	45
4.3.1 Testes preliminares.....	45
4.3.2 Planejamento fatorial	46
4.3.3 Dextrose equivalente (DE).....	47
4.3.4 Porcentagem de hidrólise	48
4.4 Obtenção das microcápsulas	48
4.5 Conteúdo total e superficial de β caroteno.	50
4.6 Caracterização das microcápsulas	51
4.6.1 Microscopia ótica	51
4.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	51
4.6.3 Determinação do conteúdo de umidade das microcápsulas	51
4.6.4 Análise granulométrica	52
4.6.5 Determinação da solubilidade	52
4.6.6 Temperatura de transição vítrea	52
4.6.7 Determinação das isotermas de sorção	53
4.6.8 Calor isostérico e entropia diferencial de sorção	54
4.7 Estabilidade das microcápsulas	55
4.7.1 Termossensibilidade e influência do oxigênio	55
4.7.2 Fotossensibilidade	55
4.8 Análise colorimétrica	56
4.9 Modelagem cinética	57
4.10 Análise estatística	59
Capítulo 5 – Resultados e Discussão	60
5.1 Hidrólise do amido de pinhão	60
5.1.1 Estudos preliminares	60
5.1.2 Efeito da temperatura e concentração de ácido.....	61
5.2 Caracterização das microcápsulas	66
5.2.1 Microscopia eletrônica de varredura	66
5.2.2 Conteúdo total e superficial de β -caroteno	72
5.2.3 Conteúdo de umidade.....	74
5.2.4 Distribuição granulométrica.....	75
5.2.5 Solubilidade	77

5.2.6 Propriedades térmicas e termodinâmicas	79
5.2.7 Isotermas de sorção de água.....	84
5.3 Estabilidade das microcápsulas preparadas com amido nativo e hidrolisado	89
5.4 Análise colorimétrica.....	99
Conclusões	113
Sugestões para Trabalhos Futuros.....	116
Referências Bibliográficas	118
Apêndice A	136
Apêndice B	137
Apêndice C	138
Apêndice D	140
Apêndice E	141
Apêndice F.....	144
Apêndice G	147

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelos de microcápsulas. a) microcápsula simples; b) simples,.....	7
Figura 2. Estrutura porosa de alimento liofilizado.	9
Figura 3. Diagrama de fases da água.....	10
Figura 4. Períodos da liofilização.....	10
Figura 5. Ilustração de microcápsulas de polifenóis preparadas através de diferentes métodos. 12	
Figura 6. Ilustração esquemática de uma curva DSC com as temperaturas de transição (T_o , T_g e T_f)	15
Figura 7. Representação dos cinco tipos de isotermas de sorção para alimentos descritos por BET	17
Figura 8. Estruturas químicas da amilose (a) e amilopectina (b).	19
Figura 9. Fotografia do Pinheiro do Paraná (<i>Araucária angustifolia</i>)	23
Figura 10. Pinha (fruto da <i>Araucaria angustifolia</i>) contendo pinhões.....	24
Figura 11. Estrutura química de alguns carotenóides.....	33
Figura 12. Esquema de degradação de carotenóides a compostos de baixa massa molar.	37
Figura 13. Estrutura química do β -caroteno ($C_{40}H_{56}$)	39
Figura 14. Reação do ácido 3,5 dinitrossalicílico com açúcar redutor.....	47
Figura 15. Liofilizador utilizado na secagem das amostras.	49
Figura 16. Diagrama representativo do sistema de cores CIELAB.....	56
Figura 17. Superfície de contorno da interação entre a temperatura e concentração de ácido clorídrico sobre a DE.....	64
Figura 18. Fotomicrografias obtidas por MEV do amido nativo. 1000 x (A) 1500 x (B) e 3000 x (C).	67
Figura 19. Fotomicrografias obtidas por MEV do amido hidrolisado DE 6.	67
Figura 20. Fotomicrografias obtidas por MEV do amido hidrolisado DE 12.	68
Figura 21. Fotomicrografias obtidas por MEV do β -caroteno em magnitudes de 1500 x (A), 3000 x (B) e 5000 x (C).	68
Figura 22. Fotomicrografias obtidas pela microscopia ótica (100 x) das cápsulas obtidas com o amido nativo (A), amido hidrolisado DE12 (B), amido nativo e gelatina (C) e amido hidrolisado DE 12 e gelatina (D).	69

Figura 23. Fotomicrografias obtidas através da MEV das cápsulas preparadas com amido nativo, a 500 x (A) e 1500 x (B) amido hidrolisado (DE 6) a 1000 x (C) e 1500 x (D) e amido hidrolisado (DE 12) a 1000 x (E) e 1500 x (F).	70
Figura 24. Fotomicrografias obtidas através da MEV das cápsulas preparadas com amido nativo, a 500 x (A) e 1500 x (B); amido hidrolisado (DE 6) a 1000 x (C) e 1500 x (D) e amido hidrolisado (DE 12) a 1000 x (E) e 1500 x (F) com gelatina.	72
Figura 25. Termograma do amido de pinhão nativo.	81
Figura 26. Termograma do amido de pinhão hidrolisado DE 12.	82
Figura 27. Termograma da cápsula liofilizada preparada com amido de pinhão nativo.	82
Figura 28. Termograma da cápsula liofilizada preparada com amido de pinhão nativo e gelatina.	83
Figura 29. Termograma da cápsula liofilizada preparada com amido de pinhão hidrolisado DE 12.	83
Figura 30. Isotermas de sorção para as cápsulas produzidas com amido hidrolisado DE 12 em diferentes temperaturas. Os símbolos representam os valores experimentais de umidade de equilíbrio (base seca) e as linhas os preditos pelo modelo de Peleg em função da atividade da água (a_w).	86
Figura 31. Entalpia diferencial de adsorção das cápsulas liofilizadas preparadas com amido de pinhão hidrolisado DE 12 em função da umidade de equilíbrio.	88
Figura 32. Entropia diferencial de adsorção das cápsulas liofilizadas preparadas com amido de pinhão hidrolisado DE 12 em função da umidade de equilíbrio.	88
Figura 33. Valores experimentais e preditos por um modelo cinético de primeira ordem referente à concentração de β -caroteno em pó, livre, a 10°C e 30°C na ausência de luz e exposto à luz a temperatura ambiente (25±2).	89
Figura 34. Valores experimentais e preditos por um modelo cinético de primeira ordem referente à concentração do β -caroteno encapsulado nos diferentes materiais de parede e estocado a 10°C em condições aeróbias.	91
Figura 35. Valores experimentais para o β -caroteno encapsulado com amido hidrolisado DE 12 e estocado em diferentes condições: 10°C e 30°C na presença e ausência de oxigênio, e na presença e ausência de luz com oxigênio à temperatura ambiente.	94
Figura 36. Valores experimentais referentes à concentração do β -caroteno encapsulado com amido hidrolisado DE 12 e estocado a 10 e 30°C em condições ambientais de oxigênio.	98
Figura 37. Mudanças ocorridas no parâmetro de cor L^* em função do tempo, para as cápsulas preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG), armazenadas no escuro (a) e expostas à luz UV (b) a temperatura ambiente (25 ± 2 °C).	101

Figura 38. Mudanças ocorridas no parâmetro de cor a^* em função do tempo, para as cápsulas preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG), armazenadas no escuro (a) e expostas à luz UV (b) a temperatura ambiente (25 ± 2 °C).....	102
Figura 39. Mudanças ocorridas no parâmetro de cor b^* em função do tempo, para as cápsulas preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG), armazenadas no escuro (a) e expostas à luz UV (b) a temperatura ambiente (25 ± 2 °C).....	103
Figura 40. Mudanças ocorridas no ângulo de tonalidade (H^*) em função do tempo, para as cápsulas preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG), armazenadas no escuro (a) e expostas à luz UV (b) a temperatura ambiente (25 ± 2 °C)..	105
Figura 41. Mudanças ocorridas no Chroma (C) em função do tempo, para as cápsulas preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG), armazenadas no escuro (a) e expostas à luz UV (b) a temperatura ambiente.....	106
Figura 42. Mudanças ocorridas na diferença de cor total (ΔE^*) em função do tempo, para as cápsulas preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG), armazenadas no escuro (a) e expostas à luz UV (b) a temperatura ambiente.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos físicos, químicos e físico-químicos utilizados para encapsulação de compostos.....	8
Tabela 2. Modelos de isotermas de sorção utilizados para ajuste dos dados experimentais.....	17
Tabela 3. Composição físico-química do pinhão cru e cozido.....	25
Tabela 4. Características do amido de milho e seus hidrolisados em relação aos seguintes parâmetros: higroscopicidade, poder edulcorante, solubilidade, viscosidade e retenção de voláteis.....	28
Tabela 5. Importância da encapsulação de alguns ingredientes utilizados na indústria de alimentos.....	32
Tabela 6. Planejamento Fatorial 22 com repetição no ponto central referente à hidrólise ácida do amido de pinhão.....	46
Tabela 7. Nomenclatura das cápsulas obtidas com diferentes agentes encapsulantes.....	49
Tabela 8. Atividade de água das soluções salinas saturadas utilizadas na determinação das isotermas de sorção das microcápsulas preparadas com amido DE 12 em diferentes temperaturas.....	54
Tabela 9. Valores de dextrose equivalente (DE) encontrados no estudo preliminar de tempo de reação de hidrólise a 37°C concentração de ácido de 3 mol.L ⁻¹	61
Tabela 10. Valores de dextrose equivalente (DE) e porcentagem de hidrólise do planejamento fatorial 22 referente à hidrólise do amido de pinhão.....	62
Tabela 11. Magnitude dos efeitos dos fatores estimados na análise de regressão para as variáveis codificadas sobre o DE.....	63
Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) da regressão e da falta de ajuste para o índice de dextrose equivalente (DE).....	63
Tabela 13. Conteúdo total e superficial de carotenóide apresentado pelas microcápsulas preparadas a partir de amido nativo sem (A) e com gelatina (AG), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG).....	73
Tabela 14. Resultado da análise granulométrica das amostras de amido de pinhão nativo e hidrolisado DE 12 e das microcápsulas preparadas a partir de amido nativo sem (A) e com gelatina (AG), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG).....	76
Tabela 15. Solubilidade em água fria (20°C) e quente (80°C) apresentada pelas microcápsulas liofilizadas preparadas a partir de amido nativo sem (A) e com gelatina (AG), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG).....	78

Tabela 16. Propriedades térmicas e termodinâmicas do amido nativo, amido hidrolisado DE 12 e das microcápsulas preparadas a partir de amido nativo sem (A) e com gelatina (AG) e amido hidrolisado DE 12.	79
Tabela 17. Valores de atividade água (a_w) e umidade de equilíbrio em base seca (X_{eq}) encontrados para as cápsulas preparadas com amido hidrolisado DE 12, em diferentes temperaturas (10, 20 e 30°C).	84
Tabela 18. Parâmetros dos modelos referentes às isotermas de sorção das cápsulas preparadas com amido hidrolisado com DE igual a 12 com os respectivos valores de R^2 e ERM.	85
Tabela 19. Resultados da regressão linear quanto à degradação de β -caroteno livre utilizando modelo cinético de primeira ordem, nas diferentes condições testadas temperaturas de 10 e 30°C na ausência de luz e em presença de luz a $25 \pm 2^\circ\text{C}$	90
Tabela 20. Resultados da regressão linear, quanto à degradação de β -caroteno nas cápsulas preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG), utilizando modelos cinéticos de primeira ordem, estocado a 10 e 30°C em condições ambientais e em atmosferas de nitrogênio.	92
Tabela 21. Resultados da regressão linear quanto à degradação de β -caroteno nas cápsulas preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG), utilizando um modelo cinético de primeira ordem, para as amostras expostas à luz e armazenadas no escuro à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), em condições ambientais de oxigênio.	94
Tabela 22. Resultados da estabilidade de carotenóides encapsulados em diferentes materiais de parede por diferentes autores.....	96
Tabela 23. Resultados da regressão linear quanto à degradação de β -caroteno nas cápsulas feitas com amido hidrolisado DE 12, expostas em diferentes condições de estocagem, utilizando o modelo de Weibull.	97
Tabela 24. Resultados da regressão linear dos parâmetros de cor (L^* e a^*), diferença de cor total (ΔE^*), ângulo de tonalidade (H^*) e Chroma (C^*) utilizando modelos cinéticos de ordem zero e primeira ordem para as cápsulas expostas à luz UV preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG).	109
Tabela 25. Resultados referentes aos parâmetros de cor (L^* e a^*), diferença de cor total (ΔE^*), ângulo de tonalidade (H^*) e Chroma (C^*) utilizando modelos cinéticos de ordem zero e primeira ordem, para as amostra armazenadas no escuro à temperatura ambiente preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG).	110
Tabela 26. Resultados referentes aos parâmetros de cor (L^* e a^*), diferença de cor total (ΔE^*), ângulo de tonalidade (H^*) e Chroma (C^*) utilizando modelos cinéticos de ordem zero e primeira ordem, para as amostra armazenadas a 10°C preparadas a partir de amido nativo (A),	

amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG)..... 111

Tabela 27. Resultados referentes aos parâmetros de cor (L^* e a^*), diferença de cor total (ΔE^*), ângulo de tonalidade (H^*) e Chroma (C^*) utilizando modelos cinéticos de ordem zero e primeira ordem, para as amostra armazenadas a 30°C preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG)..... 112

Lista de siglas, abreviaturas e símbolos

A	constante de equações
A	cápsulas preparadas com amido nativo
<i>a</i>	absortividade
<i>a</i> *	parâmetro de cor
<i>Abs</i>	absorbância
ADNS	ácido dinitrosalicílico
AG	cápsulas preparadas com amido nativo e gelatina
Aw	atividade de água
ARS	quantidade de açúcar redutor do sobrenadante
B	cápsulas preparadas com amido hidrolisado com DE igual a 6
<i>B</i>	constante de equações
<i>b</i>	largura da cubeta
<i>b</i> *	parâmetro de cor
BG	cápsulas preparadas com amido hidrolisado com DE igual a 6 e gelatina
b.u.	base úmida
b.s.	base seca
C	cápsulas preparadas com amido hidrolisado com DE igual a 12
<i>C</i>	constante de equações
<i>c</i>	concentração (g. mL ⁻¹)
<i>C</i> *	chroma (parâmetro de cor)
CAR	radical carotenóide
CG	cápsulas preparadas com amido hidrolisado com DE igual a 12 e gelatina
CV %	coeficiente de variação percentual
DE	dextrose equivalente
DP	grau de polimerização (<i>degree of polymerization</i>)
DSC	calorimetria diferencial de varredura (<i>differential scanning calorimetry</i>)
ERM	erro relativo médio
exp	experimental
<i>H</i> *	ângulo de tonalidade

K	constante de equações
k	velocidade de reação
L^*	parâmetro de cor (luminosidade)
log	logaritmo
m	número de parâmetros
m/v	relação massa/volume
EV	microscopia eletrônica de varredura
n	constante de equações
N	número de pontos experimentais
pred	predito
m/m	relação massa/massa
H (%)	porcentagem de hidrólise
Q	fator de qualidade medido
QAT	quantidade de amido total no início da hidrólise
QST	calor de sorção total
R	constante universal dos gases
R^2	coeficiente de regressão
t	tempo em (s), (h) ou dias
$t_{1/2}$	tempo de meia-vida
T	temperatura ($^{\circ}\text{C}$) ou (K)
T_g	temperatura de transição vítrea
T_0	temperatura do início do intervalo de do pico endotérmico
T_f	temperatura final do pico endotérmico
URE	umidade relativa de equilíbrio
X	umidade de equilíbrio (kg água/kg de sólidos secos ⁻¹)
X_e	umidade de equilíbrio experimental (kg água/kg sólidos secos)
X_m	umidade de monocamada
X_p	umidade de equilíbrio predita (kg água/kg sólidos secos)
x_1 e x_2	variáveis independentes
y_i	variável de resposta
W	watts

Símbolos gregos

α_n	coeficientes de regressão multilinear
Δh	calor isostérico de sorção (cal. mol ⁻¹)
ΔH_g	entalpia de gelatinização (cal. mol ⁻¹)
ΔH_v	calor latente de vaporização da água livre (cal. mol ⁻¹)
ΔS	entropia diferencial de sorção (cal. mol ⁻¹ . K ⁻¹)

Subscritos

<i>e</i>	experimental
<i>p</i>	predito
<i>t</i>	qualquer tempo t
<i>0</i>	inicial

Capítulo 1 - Introdução

A estabilidade de compostos como corantes, aromas, vitaminas, e outros ingredientes alimentares sensíveis representa uma das principais dificuldades encontradas na área de alimentos. Para contornar esse tipo de problema, a técnica da microencapsulação começou a ser estudada e empregada, apresentando, hoje, um importante papel na indústria de alimentos. Essa técnica utiliza agentes encapsulantes para revestir os compostos sensíveis, e pode ser empregada não só para proteger o núcleo ou material encapsulado contra reações adversas, mas também para prevenir a perda de compostos voláteis, controlar a liberação de ingredientes e, até mesmo, mascarar sabores indesejáveis.

A goma arábica corresponde a um material de parede bem conhecido há muitos anos, sendo considerada um agente encapsulante por excelência, por produzir emulsões estáveis com boas propriedades de retenção, porém existem limitações associadas com o uso dessa goma como o alto custo e a oferta limitada. A busca por substitutos totais ou parciais para a goma arábica tem sido incentivada, surgindo assim estudos com outros agentes como o amido, visto que ele é um material abundante e barato. Como o uso do amido nativo acaba sendo restringido devido às suas limitações como baixa resistência térmica, alta tendência à retrogradação, e formação de suspensões com elevada viscosidade, realiza-se a técnica de modificação que permite alterar propriedades funcionais e assim adequar o amido aos fins desejados.

Os amidos modificados empregados como agentes encapsulantes correspondem aos amidos hidrolisados por ácidos ou enzimas, emulsificados através de ligações com grupamentos lipofílicos e os oxidados pelo periodato de sódio. No presente trabalho, somente a modificação via hidrólise ácida foi utilizada, devido ao baixo custo associado

a esta técnica, e aos produtos resultantes que são capazes de conferir ao encapsulado boa proteção contra oxidação.

Diferentes fontes de amido já foram estudadas como agentes encapsulantes, porém não existem trabalhos utilizando o amido de pinhão com este propósito. O pinhão é oriundo do Pinheiro do Paraná (*Araucária angustifolia*), que, hoje, está em risco de extinção e encontra-se sob proteção ambiental. O pinhão também se destaca por ser considerado uma fonte de amido devido à presença de uma alta quantidade deste componente (~34%). Estimular pesquisas relacionadas ao uso sustentável da Araucária, além do consumo de sua semente, constitui-se em elemento fundamental à preservação da espécie, uma vez que a exploração deixaria de ser depredatória, com o incremento do plantio. Além de ser considerado uma fonte de amido devido à presença de uma alta quantidade deste componente (~34%)

Outro aspecto importante corresponde à literatura a respeito do pinhão, que é escassa, visto que existem, somente, alguns trabalhos reportando propriedades físico-químicas e nutricionais do pinhão e características do seu amido. Além da escolha do material de parede, é preciso escolher a técnica microencapsulante e o material a ser encapsulado. O processo de encapsulação pode ser realizado por várias técnicas, dentre elas a liofilização, que corresponde a uma tecnologia de secagem baseada na desidratação via sublimação do produto congelado. Cabe ressaltar que este método ainda encontra-se pouco explorado, visto que a atomização ganhou mais força nos últimos anos devido ao seu tempo de processo e custo relativamente baixo.

Será avaliado o amido de pinhão como encapsulante do β -caroteno. A escolha desse material se deve às fortes restrições impostas pelo mercado ao uso de corantes sintéticos. Atualmente, existe uma crescente substituição desses corantes por pigmentos naturais, no entanto, além de mais caros que os sintéticos, eles são muito instáveis quimicamente. O interesse nos carotenóides, não corresponde somente ao seu alto poder corante, mas também a sua atividade pró-vitáminica A e ação antioxidante, logo o β -caroteno pode ser incorporado nos alimentos com o propósito de pigmentar e melhorar propriedades funcionais. Como esses pigmentos são muito suscetíveis à oxidação e isomerização, que resultam em perda de cor, a encapsulação é empregada com o propósito de evitar essa degradação e, ainda possibilitar a dispersão dos mesmos em água, facilitando sua aplicação em alimentos.

Capítulo 2 - Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi estudar uma nova aplicação do pinhão na indústria de alimentos visando a utilização do seu amido. Para tanto, foi avaliado o potencial do amido nativo, amido modificado e mistura de ambos com a gelatina, como agentes encapsulantes, utilizando β -caroteno como núcleo (composto ativo a ser encapsulado) e a liofilização como técnica encapsulante.

2.2 Objetivos específicos

- a) Extrair o amido do pinhão e modificá-lo através da hidrólise ácida sob diferentes condições de hidrólise (tempo, temperatura e concentração de ácido) a fim de obter amidos com graus de hidrólise diferenciados.
- b) Utilizar a liofilização como técnica de encapsulação.
- c) Caracterizar as cápsulas produzidas com amido nativo, amido modificado e gelatina quanto à eficiência, conteúdo superficial, estrutura morfológica, tamanho de partícula, temperatura de transição vítrea, solubilidade em água e umidade.
- d) Determinar as isotermas de sorção das cápsulas produzidas com o material que apresentar melhores características de retenção como maior eficiência (conteúdo total) e menor conteúdo superficial de β -caroteno.

-
- e) Avaliar a termossensibilidade (10 e 30°C) e a fotossensibilidade (exposição à luz UV) do β -caroteno encapsulado nos diferentes materiais de parede testados.

Capítulo 3 - Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica

Neste capítulo são tratados assuntos de importância para o entendimento do presente trabalho, como princípios e objetivos da microencapsulação, técnicas de encapsulação, agentes encapsulantes, compostos que podem ser encapsulados, e outros conceitos relevantes. Além disso, serão apresentados fundamentos teóricos sobre o material encapsulante que corresponde ao amido de pinhão e a respeito do produto a ser encapsulado, o β -caroteno.

3.1 Microencapsulação

3.1.1 Histórico

Em 1930, datam os primeiros registros de tentativas de utilização de técnicas de encapsulação, mas somente na década de 1950 surgiram os primeiros produtos com material encapsulado. O processo de coacervação, desenvolvido por Barret K. Green, do *National Cash Register Corporation (NCR)*, EUA, foi primeiramente aplicado no desenvolvimento de cápsulas contendo um corante, que foram impregnadas em papel para a substituição do papel carbono, revolucionando a indústria de formulários. Esse papel recebia uma fina camada de microcápsulas contendo um corante não ativado (incolor), recoberta por outra camada contendo um reagente também incolor. A pressão da ponta do lápis na superfície do papel rompia as microcápsulas, liberando o corante

incolor que, em contato com o reagente, adquiria cor, produzindo em outra folha uma cópia idêntica ao que estava sendo escrito no primeiro papel (Ré, 1998).

Em 1960, os estudos de microencapsulação foram iniciados na área de alimentos pelo Instituto de Pesquisas *Southwest*, nos Estados Unidos, com a microencapsulação de óleos essenciais para prevenir a oxidação e perda de substâncias voláteis e controlar a liberação do aroma. Além dos aromas, a aplicação dessa tecnologia estendeu-se à incorporação de aditivos naturais e ingredientes que alteram a textura, melhoram a qualidade nutricional, aumentam a vida de prateleira ou controlam propriedades de alimentos processados como, por exemplo, corantes, acidulantes, conservantes, vitaminas, minerais e outros (Ré, 1998).

Em 2002, mais de 1000 patentes envolveram processos de microencapsulação e suas aplicações, sendo 300 dessas patentes associadas especificamente a microencapsulação de ingredientes alimentícios (Gouin, 2004).

3.1.2 Princípios e objetivos

A microencapsulação corresponde à tecnologia de empacotamento que, com finas camadas poliméricas aplicáveis em sólidos, gotículas de líquido ou material gasoso, formam partículas denominadas microcápsulas, que podem liberar seu conteúdo sob velocidade e condições específicas (Sparks, 1981). O material encapsulado pode ser referido como núcleo, fase interna ou recheio, enquanto que o encapsulante pode ser chamado de concha, revestimento, material de parede ou membrana (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Alguns autores classificam as cápsulas em dois grupos: o grupo que caracteriza as verdadeiras microcápsulas, onde o núcleo é nitidamente concentrado na região central, circundado por um filme definido e contínuo do material de parede, e o grupo no qual o núcleo é uniformemente disperso em uma matriz, classificado como sistema matricial (microesferas) (Azeredo, 2005). Por sua vez, Depypere (2003), defende a ideia de que na verdadeira encapsulação, não ocorre a exposição superficial do material de recheio, o que acontece nas microesferas, sendo esta a principal diferença entre microcápsulas e microesferas. As microcápsulas podem ter ainda mais de um núcleo, ou várias paredes para um mesmo núcleo (Constant, 2002). A Figura 1 apresenta alguns dos principais modelos de microcápsulas. Em um trabalho mais recente, Vos *et al.*

(2010) cita a diferença entre a encapsulação e a técnica de imobilização. Na imobilização o composto ativo é coberto, mas não necessariamente empacotado por uma matriz, ocorrendo a exposição de material na superfície, o que não é desejado na encapsulação.

Quanto ao tamanho, as cápsulas podem ser classificadas em 3 categorias: macro- (>5000 μm), micro- (0,2-5000 μm) e nanocápsulas (<0,2 μm) (Nori, 1996).

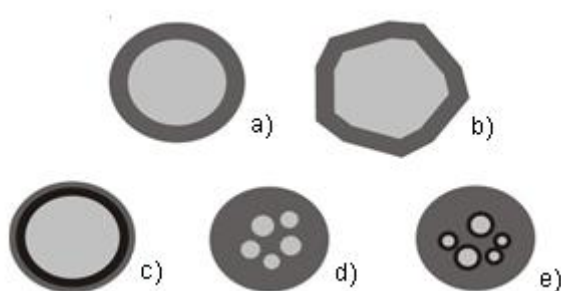


Figura 1. Modelos de microcápsulas. a) microcápsula simples; b) simples, irregular; c) duas paredes; d) vários núcleos; e) agrupamento de microcápsulas.
Fonte: Constant (2002)

Conforme Shahidi e Han (1993), a indústria de alimentos emprega a microencapsulação por inúmeras razões: reduzir a reatividade do material de núcleo com o ambiente; proteger contra condições ambientais adversas; proteger contra condições deletérias no trato intestinal; diminuir a velocidade de evaporação ou de transferência do recheio (fase interna) para o meio; facilitar a manipulação do material encapsulado; promover liberação controlada; mascarar sabor e odor desagradáveis e promover a diluição homogênea do material encapsulado em uma formulação alimentícia.

3.1.3 Técnicas de encapsulação

Vários métodos são empregados para encapsular, entre os quais destacam-se os citados na Tabela 1, porém, a escolha do método de encapsulação para uma aplicação específica depende de uma série de fatores, como: tamanho de partículas requerido, propriedades físicas e químicas do núcleo e da parede, aplicação do produto final, mecanismos desejados de liberação, escala de produção e custo (Jackson e Lee, 1991).

Tabela 1. Métodos físicos, químicos e físico-químicos utilizados para encapsulação de compostos.

Classificação dos métodos	Métodos de encapsulação
Métodos físicos	Extrusão estacionária
	Bocal submerso
	Extrusão centrífuga
	Bocal vibrante
	<i>Spray drying</i>
	Disco rotativo
	<i>Pan coating</i>
	Suspensão por ar
	<i>Spray chilling e spray cooling</i>
	Leito fluidizado
	Co-cristalização
Métodos químicos	Liofilização
	Polimerização interfacial
	Inclusão molecular
Métodos físico-químicos	Polimerização <i>in situ</i>
	Coacervação simples
	Coacervação complexa
	Lipossomas
	Lipoesferas (<i>solid lipid nanoparticles e nanostructured lipid carriers</i>)
Evaporação do solvente	

Fonte: Shahidi e Han (1993), Desai e Park (2005) e Madene (2006).

A secagem por atomização (*spray drying*) é uma técnica relativamente barata, e a mais utilizada pela indústria de alimentos para microencapsular compostos; as variáveis deste processo correspondem às temperaturas do ar de entrada e saída do secador, ao fluxo de ar ou do fluido de arraste, à distribuição de temperatura e umidade, ao tempo de residência e à geometria da câmara de secagem (Gibbs, 1999).

A técnica de liofilização será apresentada e discutida com mais detalhes, pois é a técnica estudada neste trabalho e foi escolhida devido à disponibilidade de equipamento e ao fato de ser uma técnica de microencapsulação pouco explorada na literatura.

3.1.3.1 Liofilização ou freeze drying

O processo de encapsulação pode ser realizado por meio da liofilização de uma suspensão do material de núcleo com um material de parede (Azeredo, 2005). A liofilização ou *freeze-drying* é um método de desidratação de materiais congelados pelo processo de sublimação sob alto vácuo, ou seja, ocorre a retirada da água do alimento sem submetê-lo a altas temperaturas, comuns nos processos de desidratação (80-90 °C) (Martins, 2000). Essa técnica pode ser utilizada para desidratar alimentos líquidos como café e sucos, mas ela é especialmente empregada na secagem de alimentos sólidos de alto valor como morango, camarão e cogumelo. Esses tipos de alimentos, além de terem *flavors* e coloração delicados, possuem atributos como textura e aparência que não são bem preservados por qualquer método de secagem. A liofilização permite minimizar mudanças que normalmente ocorrem durante a secagem, pois além de utilizar baixas temperaturas, os alimentos quando congelados têm chances pequenas de romper ou distorcer sua estrutura enquanto perdem sua umidade (Potter e Hotchkiss, 1998).

As principais vantagens oferecidas por esse método são: manutenção da forma original, manutenção do valor nutritivo, manutenção das características sensoriais e redução de processos indesejáveis tais como desnaturação proteica, perda de compostos voláteis, formação de camadas duras e impermeáveis, migração de sólidos solúveis para a superfície durante a secagem e dificuldade de reidratação (Martins, 2000; Marques *et al.*, 2006). As desvantagens da liofilização são os altos custos fixos e operacionais e o elevado tempo de processo (Marques *et al.*, 2006).

A textura dos alimentos liofilizados é bem mantida, havendo pouco encolhimento e nenhuma formação de crosta na superfície. A estrutura porosa aberta (Figura 2) permite uma rápida e completa reidratação, porém ela é frágil e requer proteção contra danos mecânicos (Fellows, 2006).



Figura 2. Estrutura porosa de alimento liofilizado.
Fonte: Fellows (2006).

O fundamento físico para a liofilização é a coexistência dos três estados da água (sólido, líquido e gasoso) em determinadas condições de pressão e temperatura. Assim, em temperaturas de aproximadamente 0 °C e pressões de 610 Pa, obtém-se o chamado ponto triplo da água (Figura 3), possibilitando sua passagem diretamente do estado sólido para o gasoso, sem passar pelo líquido, ou seja, por sublimação (Martins, 2000; Vieira e Ho, 2008).

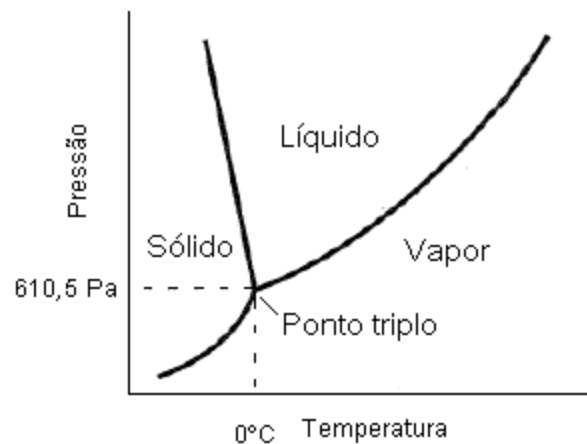


Figura 3. Diagrama de fases da água.
Fonte: Fellows (2006)

A liofilização é completada por três etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária, conforme fluxograma apresentado na Figura 4 (Boss *et al.*, 2004; Chen e Wang, 2007).

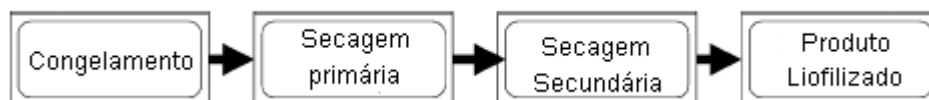


Figura 4. Períodos da liofilização
Fonte: Boss *et al.* (2004)

O congelamento é uma fase importante, ele deve ser rápido para que se formem microcristais de gelo que não danifiquem a membrana celular da estrutura do alimento. Quando o congelamento é lento, formam-se cristais grandes que rompem a membrana celular, acarretando perda do líquido citoplasmático e conseqüentemente, encolhimento do alimento que fica com aspecto de murcho. No congelamento rápido, a estrutura do alimento mantém-se intacta, conservando sua forma original e após a hidratação recompõe-se normalmente (Fellows, 2006).

A secagem primária é a etapa onde o solvente é removido por sublimação sob vácuo e adição de calor. Uma significativa quantidade de calor latente de sublimação é também consumida quando as moléculas de água sublimam e entram para a fase vapor. Devido a isso, a temperatura do produto congelado é reduzida. Então, é necessário o fornecimento de calor para o produto, que poderá ser concedido por condução, convecção e/ou radiação (Boss *et al.*, 2004). Nesta etapa o alimento pode ser desidratado até um teor de cerca de 15 % (Boss *et al.*, 2004; Fellows, 2006).

A secagem secundária é para dessorver a camada de água ou solvente que não estava congelado (Chen e Wang, 2007; Boss *et al.*, 2004; Fellows, 2006). A secagem por meio da evaporação (dessorção) da água não congelada ocorre até 2 % de umidade e é obtida pela elevação da temperatura até uma temperatura próxima da temperatura ambiente mantendo a pressão baixa (Boss *et al.*, 2004).

Os liofilizadores consistem de uma câmara a vácuo com bandejas para conter o alimento, aquecedores para suprir o calor latente de sublimação, serpentinas de refrigeração para condensar os vapores diretamente em gelo e bombas de vácuo para remover vapores não condensáveis. Os métodos utilizados para suprir o calor para a superfície do alimento podem ser via condução, radiação ou radiofrequência. Na prática, a mais baixa pressão da câmara economicamente viável é de cerca de 13 Pa e a temperatura do condensador é de cerca de -35 °C (Fellows, 2006).

Cabe ressaltar que as cápsulas liofilizadas geralmente apresentam formatos irregulares, diferente de outras técnicas de microencapsulação. As estruturas das microcápsulas obtidas pelos principais métodos de encapsulação estão apresentadas na Figura 5, onde é possível visualizar as diferenças entre elas. Percebe-se que as cápsulas preparadas por *spray drying* possuem formatos regulares, praticamente esféricos, por sua vez a liofilização, a coacervação e a cocrystalização formam cápsulas com formatos irregulares e indefinidos. Diferentes desses métodos, onde o composto encapsulado está disperso na matriz encapsulante, a inclusão molecular e os lipossomas são técnicas onde o material encapsulado fica protegido em uma cavidade ou região hidrofóbica e/ou hidrofílica.

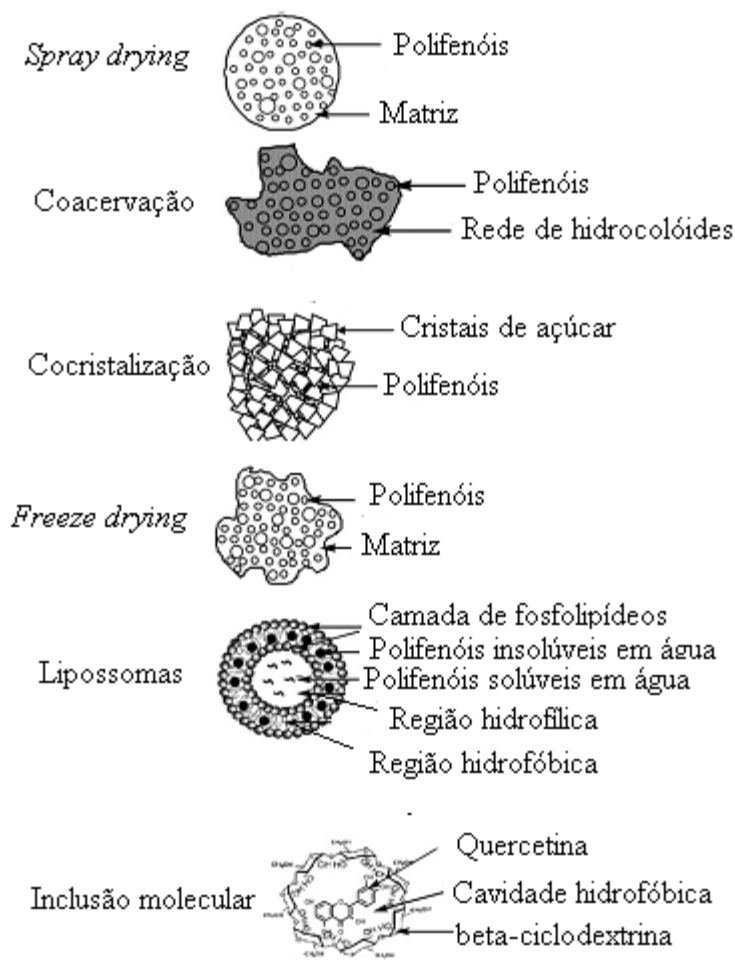


Figura 5. Ilustração de microcápsulas de polifenóis preparadas através de diferentes métodos.
Fonte: adaptado de Fang e Bhandari (2010).

3.1.4 Mecanismos de liberação

Conforme Gouin (2004), a encapsulação permite que o núcleo seja isolado do ambiente externo até que a liberação seja desejada, ou seja, esta técnica permite a liberação no local e no momento adequado. A liberação do material ativo (núcleo) das microcápsulas pode ocorrer através da ruptura mecânica, pela ação da temperatura, pela ação do pH, pela solubilidade no meio, através da biodegradação, e também por difusão (Whorton, 1995).

A difusão ocorre, principalmente, quando a parede da microcápsula estiver íntegra, a taxa de liberação é governada pelas propriedades químicas do núcleo e do material encapsulante, assim como por algumas propriedades físicas da parede, como estrutura da matriz e dimensões dos poros (Shahidi e Han, 1993). O estado físico do material de parede corresponde a outro fator de grande importância, materiais no estado

vítreo são geralmente bem mais impermeáveis que no estado elastomérico, logo a liberação do núcleo ocorre quando a estrutura vítrea da matriz sofre transição para um estado elastomérico, de maior mobilidade (Azeredo, 2005). A liberação ativada por degradação ocorre quando enzimas como proteases e lipases degradam proteínas ou lipídios, respectivamente. Quando o material de parede é uma cera ou gordura e ocorre a ingestão desta cápsula, a liberação do núcleo no organismo ocorre, geralmente, pela degradação do material de parede pela ação de lipases (Depypere, 2003).

O material da parede, quando colocado em meios solúveis, pode se dissolver totalmente, liberando rapidamente o núcleo ou começar a se expandir, favorecendo a liberação. A ativação pela água é o mecanismo mais comum de liberação na indústria de alimentos, já que a maioria dos encapsulantes são hidrossolúveis (Azeredo, 2005). O composto ativo também pode ter sua liberação controlada através do pH de uma solução, pois mudanças no pH, resultam em alterações na solubilidade do material de parede em água, permitindo a liberação do material ativo (Pothakamury e Barbosa-Canovas, 1995).

Mudanças na temperatura podem favorecer a liberação do núcleo, visto que materiais sensíveis à temperatura colapsam ou expandem quando uma temperatura crítica é atingida e outros materiais liberam o núcleo através da fusão do material de parede (que pode ser, por exemplo, um lipídio modificado ou uma cera) por aumento de temperatura (Depypere, 2003).

Além dos mecanismos citados, pode ocorrer a ruptura das microcápsulas quando uma pressão é aplicada à parede das mesmas, por exemplo, durante a mastigação, que permite a liberação de compostos de sabor em gomas de mascar (Pothakamury e Barbosa-Canovas, 1995).

3.1.5 Caracterização das microcápsulas

Conforme Thies (1995), as principais propriedades das microcápsulas que devem ser consideradas em sua caracterização, e as principais técnicas utilizadas para esse propósito são: estrutura geral, externa e interna (microscopia óptica e eletrônica); estrutura fina (raio X e análise térmica); tamanho e distribuição do tamanho das partículas (microscopia eletrônica e analisador de tamanho de partículas); composição da casca e recheio (análise térmica, química, cromatografia e espectroscopia);

comportamento de liberação (mudanças de massa, cromatografia e espectroscopia); propriedades físicas (compressão estática, resistência ao cisalhamento, mobilidade eletroforética); comportamento em ambientes com diferentes umidades relativas (isotermas de sorção); comportamento de liberação *in vitro* e estabilidade dependente das condições intrínsecas da cápsula e das utilizadas para estocagem.

Para compreender melhor a importância de algumas análises executadas no presente trabalho, os itens abaixo visam explicar o que são as isotermas de sorção e a calorimetria diferencial de varredura (DSC).

3.1.5.1 Temperatura de transição vítrea

A transição vítrea é a transição de fases mais comum observada em alimentos, que consiste em uma mudança de fase de segunda ordem de um estado sólido-vítreo para um estado semi-líquido gomoso. A transição vítrea em materiais amorfos ocorre em uma faixa de temperatura, mas geralmente é associada a um único valor – a temperatura de transição vítrea (Roos, 1995).

Essa temperatura varia com a composição dos alimentos, principalmente com a concentração de água. O conhecimento do comportamento da temperatura de transição vítrea em função da umidade dos alimentos é essencial para a determinação das melhores condições de processamento e armazenagem dos alimentos (Roos, 1995). No caso do amido, a temperatura de transição vítrea está muito próxima da temperatura de gelatinização (T_g), sendo de difícil verificação (Zelevack e Hosney, 1987 apud Mestres, 1996).

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é a técnica mais usada para detectar as transições térmicas de primeira (fusão) e de segunda ordem (vítreas) em diversos materiais e quando aplicada ao amido, fornece medidas quantitativas do fluxo de calor associado à gelatinização, onde a presença dos picos endotérmicos é um indicativo da fusão da molécula (Cruz-Orea *et al.*, 2002). No entanto, a medição de T_g por DSC não é fácil, pois a mudança da capacidade calorífica ou o sinal no fluxo de calor é normalmente mais fraco do que o de polímeros convencionais. Por exemplo, o calor de fusão do polipropileno é de cerca de 80 kcal g⁻¹, enquanto que a medida da energia para a gelatinização do amido é de apenas 0,95 cal g⁻¹ (Liu, 2006).

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é a técnica na qual a diferença da entalpia entre a amostra e um material de referência é medida em função da temperatura, enquanto ambas (amostra e referência) são aquecidas de acordo com uma programação controlada de temperatura. O registro é a curva DSC, onde a área dos picos tem caráter quantitativo de entalpia, visto que as medidas são obtidas em um calorímetro, sem perda de energia para o ambiente (Wendlant, 1986).

As temperaturas obtidas por este método de análise em amidos são temperaturas de início da gelatinização - *onset* (T_o), as de pico endotérmico ou de gelatinização (T_g) e as de conclusão do fenômeno de gelatinização (T_f ou T_c), assim como os dados referentes à entalpia da reação (ΔH_{gel}). Na Figura 6 estão ilustradas essas três temperaturas, a T_o é a temperatura em que a linha tangencial do lado de uma temperatura mais baixa do pico se cruza com a linha de base, T_p é a temperatura na ponta do pico, e T_f é a temperatura em que a linha tangencial do lado da temperatura alta do pico se cruza com a linha de base. A entalpia de gelatinização é expressa em joules por quilograma de amido seco e corresponde à área sob o pico limitado pela linha de base do gráfico (Altay e Gunasekaram, 2006).

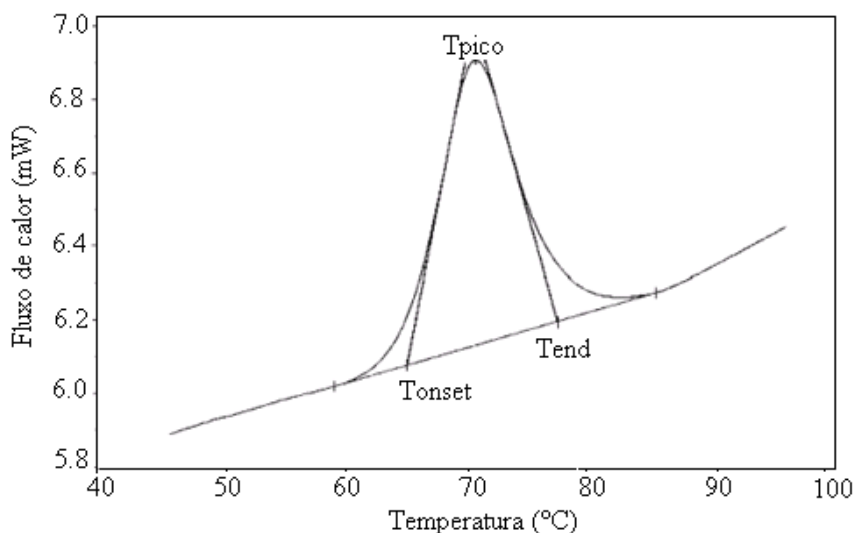


Figura 6. Ilustração esquemática de uma curva DSC com as temperaturas de transição (T_o , T_g e T_f)
Fonte: Altay e Gunasekaram (2006).

3.1.5.2 Isotermas de sorção

As isotermas de sorção relacionam a quantidade de água de um alimento com sua atividade de água (ou umidade relativa da atmosfera que circunda o alimento) uma vez alcançado o equilíbrio à temperatura constante. Essas isotermas são consideradas

uma ferramenta muito eficiente, pois podem ser utilizadas para prever mudanças na estabilidade dos alimentos, determinar métodos de estocagem, selecionar embalagens e otimizar equipamentos de secagem (Stencl, 2004). O processo de sorção não é completamente reversível, o que causa uma diferença entre as isotermas de adsorção e dessorção. A diferença existente entre os caminhos é conhecida como histerese, ela é importante na determinação da proteção necessária contra o ganho de umidade (Ordóñez, 2005; Fellows, 2006; Fennema, 2000).

Há diversos métodos utilizados para determinar a atividade de água, que são classificados em métodos diretos e indiretos. Os métodos indiretos quantificam algum outro parâmetro, como condutividade elétrica, resistência ou capacitância de um material sensível, ponto de orvalho, elasticidade de uma fibra proteica quando hidratada entre outros (Troller, 1983). Para construção das isotermas de sorção em produtos agrícolas, os métodos utilizados podem ser classificados em: (a) método gravimétrico, onde, o material é colocado em equilíbrio com ar a uma determinada temperatura e umidade relativa e, então, o teor de umidade do material é medido e, (b) aqueles em que o ar é colocado em equilíbrio com o material a uma determinada temperatura e a umidade relativa do ar é medida. Conforme (Speiss e Wolf, 1987) o método gravimétrico foi recomendado como padrão, apesar do outro método ser mais rápido.

Dependendo da natureza do alimento, cinco tipos de isotermas podem ocorrer, conforme descrito a seguir. Estes cinco tipos foram descritos em 1938 por Braunauer, Emmet e Teller (BET) (Figura 7) conforme Mathlouthi e Rogé (2003).

Tipo I - é conhecido como isotermas de Langmuir e é obtido pela adsorção de gás na camada monomolecular em sólidos porosos.

Tipo II - é a isoterma sigmóide, obtida por produtos solúveis e é representada por uma curva assintótica.

Tipo III - isoterma de Flory-Huggins, ocorre pela adsorção de um solvente ou substâncias como glicerol, abaixo da temperatura de transição vítrea.

Tipo IV - descreve a adsorção gerada por um sólido hidrofílico até máxima hidratação dos sítios de adsorção.

Tipo V - isoterma de adsorção multicamada de BET, observada pela adsorção de vapor de água, relacionada aos Tipos II e III.

As isotermas mais comumente encontradas em alimentos correspondem ao Tipo II, entre os trabalhos realizados podem ser citados a determinação de isotermas de frutas

(Hossain *et al.*, 2001, Kaymak-Ertekin e Gedik, 2004), soja (Aviara *et al.*, 2004) chá (Arslan e Togrul, 2005), amidos (Al-Muhtaseb *et al.*, 2004, Peng *et al.*, 2007, Yanniotis e Blahovec, 2009), carne (Trujillo *et al.*, 2003), pinhão (Cladera-Oliveira *et al.*, 2008) entre outros.

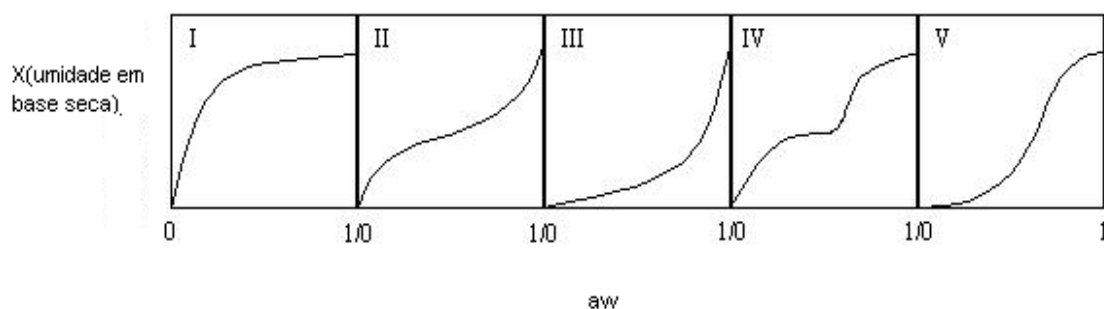


Figura 7. Representação dos cinco tipos de isotermas de sorção para alimentos descritos por BET
 Fonte: Mathlouthi e Rogé (2003)

Equações teóricas, semi-empíricas e empíricas são propostas para estimar as condições de equilíbrio de materiais biológicos. A Tabela 2 apresenta os modelos de sorção considerados neste trabalho. Outros autores também utilizaram essas equações para prever os modelos de isotermas de sorção do amido nativo do pinhão(Thys, 2009), do pinhão cru e cozido e da farinha dessa semente (Cladera-Olivera, 2008).

Tabela 2. Modelos de isotermas de sorção utilizados para ajuste dos dados experimentais.

Nome da equação	Equação
BET (Brunauer <i>et al.</i> , 1938)	$\frac{aw}{(1-aw).X} = \frac{1}{X_m.C} + \frac{(C-1)aw}{X_m.C}$
GAB (Van den Berg, 1985)	$X = \frac{X_m.C.K.aw}{(1-K.aw)(1-K.aw+C.K.aw)}$
Oswin (Lomauro <i>et al.</i> , 1985)	$X = A \left(\frac{aw}{1-aw} \right)^B$
Chung-Pfost (Chung & Pfost, 1967)	$\ln(aw) = -A \exp(-B.X)$
Henderson (Henderson, 1952)	$(1-aw) = \exp(-A.X^B)$
Smith (Smith, 1947)	$X = A + (B.\log(1-aw))$
Peleg (Peleg, 1993)	$X = k_1.aw^{n1} + k_2.aw^{n2}$
Chirife (Castillo <i>et al.</i> , 2003)	$X = \exp[A + B.\ln(C - \ln aw)]$

X, umidade de equilíbrio (g água.g de sólidos secos⁻¹), aw atividade de água, X_m (umidade de monocamada) e A, B, C, K, n são constantes das equações.

3.2 Material formador de parede

A qualidade da microencapsulação está intimamente ligada à escolha do agente encapsulante e tal escolha depende de uma série de fatores (Cardello e Celestino, 1996). O material ideal deve ter baixa viscosidade em concentrações elevadas; ser de fácil manipulação durante o processo; ter baixa higroscopicidade, para facilitar a manipulação e evitar aglomeração; ter habilidade para dispersar ou emulsificar e estabilizar o ingrediente ativo; não deve ser reativo com o material a ser encapsulado; deve ainda ter habilidade de selar e segurar o material ativo dentro da estrutura da cápsula; ser capaz de liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação; proporcionar máxima proteção ao material ativo contra condições adversas como luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos; ter solubilidade em solventes comumente utilizados; possuir as propriedades desejadas de liberação do material ativo; não possuir sabor desagradável, no caso de consumo oral e ter baixo custo (Shahidi e Han, 1993).

Como a maioria dos materiais de cobertura não possui ao mesmo tempo todas as propriedades listadas, na prática eles podem ser utilizados em combinação com outro material de cobertura e/ou modificadores, como sequestrantes de oxigênio, antioxidantes, agentes quelantes e surfactantes (Shahidi e Han, 1993).

Vários materiais podem ser utilizados como agentes encapsulantes, dentre eles: goma arábica, ágar, alginato e carragena; os carboidratos como amidos, amidos modificados, dextrinas e sacarose; as celuloses carboximetilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose; os lipídios parafina, mono e diacilgliceróis, óleos e gorduras; os materiais inorgânicos sulfato de cálcio e silicatos; as proteínas do glúten, caseína, gelatina e albumina (Jackson e Lee, 1991).

Os amidos estão sendo amplamente estudados como potenciais materiais de parede devido ao seu preço relativamente baixo e sua fácil aquisição. Os próximos itens referem-se às características do amido e da fonte de amido utilizada neste trabalho – o pinhão, e sobre amidos modificados.

3.2.1 Amido: estrutura e composição

Os grânulos de amido são compostos por dois tipos de polímeros, a amilose e a amilopectina, ambos formados por unidades de *D*-glicose e que representam de 98 a 99 % do seu peso seco, sendo que a relação dos dois polissacarídeos varia de acordo com a origem botânica do amido (Tester *et al.*, 2004). Além desses polímeros, o amido pode conter baixos teores de outras substâncias, que interferem em suas propriedades físico-químicas. Entre esses compostos de constituição citam-se os nitrogenados, lipídios e os minerais, como o fósforo (Cereda, 2001; Bobbio & Bobbio, 2003; Ordonez, 2005).

A amilose é uma molécula essencialmente linear composta por unidades de *D*-glicose através de ligações alfa (1→4) com pequeno número de ramificações. Por sua vez, a amilopectina é altamente ramificada e composta por unidades de *D*-glicose unidas através de ligações alfa (1→4) e alfa (1→6) (5 a 6%) nos pontos de ramificação (Cereda 2001). As estruturas químicas da amilose e amilopectina podem ser visualizadas na Figura 8.

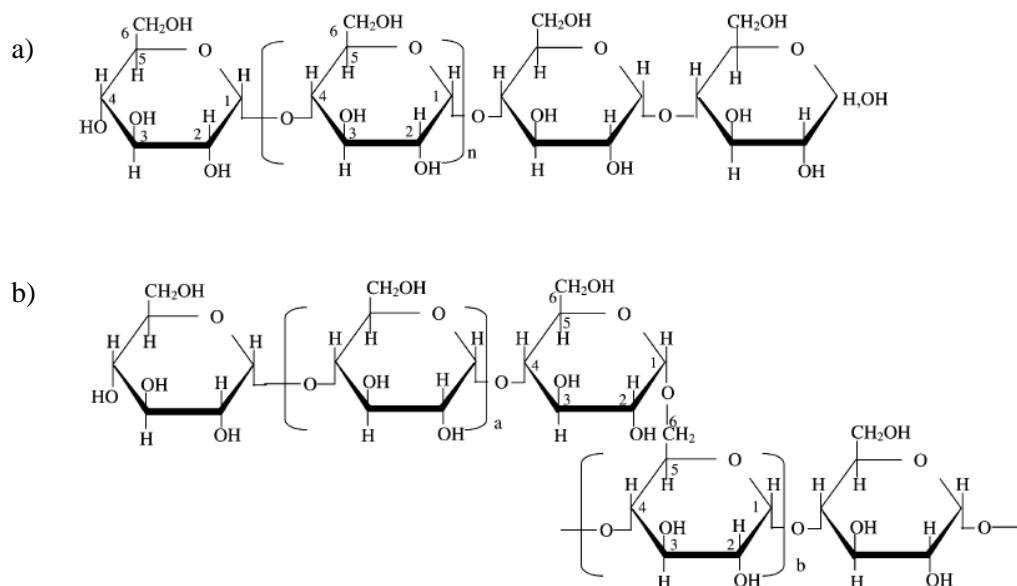


Figura 8. Estruturas químicas da amilose (a) e amilopectina (b).
Fonte: Tester *et al.* (2004).

A distribuição da massa molar da amilose é variável com as fontes botânicas e também com a forma de extração, podendo conter de 200 a 2000 unidades de glicose (Buléon, 1998). A amilopectina corresponde ao maior componente macromolecular do

amido e é responsável pela arquitetura dos grânulos, sendo composta por, aproximadamente, 6 a 35 resíduos α -D-glicosil conectados por ligações alfa (1 \rightarrow 4) (Bertoft, 2007).

Cada grânulo de amido possui um centro original de crescimento, denominado hilo, onde camadas sucessivas de amido com diferentes graus de hidratação são depositadas na forma de amilose ou amilopectina, determinando se a camada é amorfa ou cristalina (Fennema, 2000).

O grânulo do amido apresenta uma estrutura cristalina verificada pela presença de uma "cruz de malta" quando é observado com luz polarizada. O grânulo nativo tem cristalinidade variando de 15 a 45%, indicando que este tipo de arranjo não é o principal modo de organização dos biopolímeros no grânulo. Em decorrência, o grânulo apresenta então algumas zonas de estruturas rígidas e outras amorfas (Zobel, 1988).

Os grânulos são compostos de sucessivas camadas de biopolímeros que se organizam de modo cristalino (organizado) e intermediando-as com camadas de organização amorfa (French, 1984). Estudos de raios-X identificam padrões de organização dos tipos A (monoclínico), B (hexagonal), C (misto) e ainda uma configuração que foi denominada de V. O tipo A é característico de amido de cereais, o padrão B de amido de tubérculos. O padrão C é uma mistura de A e B que é característico de amido de leguminosas (Gallant *et al.*, 1997). Algumas tuberosas podem ser classificadas como sendo do tipo A, como a mandioca, a batata doce e a mandioquinha salsa (Gallant *et al.*, 1992).

Além da composição, a origem botânica reflete as características microscópicas do grânulo como variações no tamanho (1-100 μ m de diâmetro), forma (esférica, lenticular, poligonal), distribuição da forma (uni ou bi-modal) e tipo de associação (individual ou composta) (Cereda 2001).

O amido do pinhão foi caracterizado por diferentes autores (Bello-Pérez *et al.* 2006; Stahl *et al.* 2007; Thys, 2009); quanto ao conteúdo de amilose, resultados similares foram encontrados, Thys (2009) encontrou um valor de $26,3 \pm 0,7$ %, Bello-Pérez *et al.* (2006) $25,0 \pm 0,6$ % e Stahl *et al.* (2007) $23,54 \pm 1,74$ %. Para estes mesmos autores o teor de cinzas encontrado variou de 0,32 a 0,40% e o teor de fibras diferiu um pouco, variando de 0,39 a 0,86%. Os grânulos do amido de pinhão apresentam estrutura

do tipo C e formas predominantemente ovais com tamanhos de 7-25 μm (Bello-Pérez *et al.* 2006; Thys *et al.*, 2008).

3.2.2 *Propriedades do amido*

Os grânulos de amido nativo são insolúveis em água fria, mas podem absorver água de modo reversível, ou seja, retornam ao seu estado original quando secos. O aquecimento do amido em excesso de água, promove um intumescimento do grânulo e aumento de sua solubilidade. Esse poder de intumescimento e solubilidade provém da magnitude da interação entre as cadeias de amido dentro dos domínios amorfos e cristalinos. A extensão desta interação é influenciada pela razão amilose/amilopectina e pelas características da amilose e amilopectina em termos de massa molar, distribuição, grau e comprimento da ramificação e conformação (Swinkels, 1985).

Além do intumescimento granular, pode ocorrer a gelatinização em uma faixa de temperatura característica de cada fonte de amido. A gelatinização está associada ao colapso da ordem das moléculas dentro dos grânulos de amido com mudanças de propriedades concomitantes e irreversíveis, como aumento do tamanho granular, fusão de cristais, perda de birrefringência, desenvolvimento de viscosidade e solubilização do amido (Fellows, 2006).

A gelatinização pode ser caracterizada por uma endoterma obtida através de calorimetria diferencial de varredura (*DSC*), pela perda de birrefringência, observada usando-se microscopia de luz polarizada (perda da cruz de malta) e pelo desaparecimento da cristalinidade evidenciada pela difração de raios-X (Garcia *et al.*, 1997). A região amorfa do grânulo de amido hidrata-se inicialmente, pois é mais hábil ao tratamento térmico que a região cristalina e como a gelatinização se propaga por toda a região do grânulo, a consequência é a desestruturação da região cristalina, favorecendo a desorganização do grânulo, solubilizando-o. O grau de hidratação está relacionado com o poder de inchamento do grânulo de amido, influenciado pela associação molecular e pela composição química, sendo maior em féculas que nos amidos de cereais e muito mais baixa nos amidos com elevados teores de amilose. A gelatinização ocorre principalmente na região amorfa do grânulo (no hilo) e segue rapidamente para a periferia (Billiaderis, 1980). Na temperatura de gelatinização, as pontes de hidrogênio entre as cadeias de amilose e amilopectina tornam-se mais fracas e

são rompidas, promovendo redução da cristalinidade pela destruição da região cristalina, o que possibilita a entrada de água e faz com que o grânulo rompa-se e perca birrefringência (isto é, não se visualiza mais a cruz de malta sob luz polarizada) (Lobo e Silva, 2003).

O fenômeno seguinte à gelatinização denomina-se empastamento, envolve inchamento granular, separação dos componentes granulares moleculares e, eventualmente, total rompimento dos grânulos. Nesta etapa há um aumento na viscosidade da solução, ocorrendo a formação da pasta, constituída de uma fase contínua de amilose solubilizada e/ou moléculas de amilopectina, e uma fase descontínua de grânulos remanescentes (Fennema, 2000). A temperatura na qual a viscosidade começa a aumentar é chamada “temperatura de pasta”, parâmetro que pode ser obtido através de amilogramas provenientes de análises de viscosidade obtidas por viscoamilógrafos (Marcon, 2007).

Outro fenômeno que ocorre em amidos é a retrogradação, que inicia quando as moléculas de amido começam a se reassociar em uma estrutura mais ordenada (dupla hélice), tornando-se menos solúveis. Em condições favoráveis, esta estrutura ordenada pode se desenvolver na forma cristalina, formando partículas de maior tamanho que, por essa razão, podem precipitar (Atwell, 1998). Conforme Ferrero (1994) a retrogradação acontece quando o amido, em excesso de água, é aquecido acima da temperatura de gelatinização, promovendo o intumescimento irreversível. Sob resfriamento, esta suspensão forma um gel elástico metaestável que durante o armazenamento sofre mudanças estruturais. Este processo é acompanhado por um aumento gradual na rigidez e separação de fases entre polímero e solvente, ou seja, ocorre a saída da água ligada às cadeias de amilose, fenômeno denominado sinerese (Lobo e Silva, 2003).

3.2.3 O pinhão como fonte de amido

Antigamente, o Pinheiro do Paraná (*Araucaria angustifolia*, Figura 9) estava distribuído no Sul do Brasil em florestas nativas, que representavam cerca de 5-8% da área original (Wosiacki e Cereda, 1985). Atualmente, sua área remanescente está reduzida para cerca de 1%, comparativamente aos 200 000 km² de área original estimada (Embrapa, 2003).



Figura 9. Fotografia do Pinheiro do Paraná (*Araucária angustifolia*)
Fonte: Instituto de Pesquisa em Espécies Florestais (2003)

A despeito de ocupar extensas áreas, a sua exploração indiscriminada (extração irracional para fins comerciais ou desmatamento) colocou-a na lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, encontrando-se, hoje, sob proteção ambiental (Brasil, 1992). Além das áreas sul e sudeste do Brasil, esta conífera ainda pode ser encontrada na Argentina, Paraguai e Chile (Cordenunsi *et al.*, 2004).

Conforme Koch e Corrêa (2002) esta espécie está inserida no domínio da Mata Atlântica, sendo nomeada Floresta Ombrófila pelo encontro das floras temperada austro-brasileira e tropical afro-brasileira, a mesma também é conhecida como floresta de pinheiros, pinhais ou mata de araucária. Cabe destacar que o desenvolvimento deste pinheiro ocorre, geralmente, nas terras altas dos planaltos e serras, em altitudes elevadas e em climas com temperaturas moderadas durante o ano.

A *Araucaria angustifolia* é uma espécie de grande porte, visto que sua altura pode variar de 10 a 35 m e o diâmetro à altura do peito (diâmetro do tronco a 1,3 m de altura) de 0,5 a 1,2 m. Suas folhas são duras, pontiagudas e perenes; o fuste desta conífera apresenta-se cônico a quase cilíndrico em formações campestres, com ramificações pseudoverticais (Carvalho, 2004).

O fruto do Pinheiro do Paraná é conhecido como pinha e sua semente como pinhão (Figura 10). A pinha ocorre, comumente, em ramos primários e secundários do pinheiro, porém, nos ramos primários, as pinhas são maiores, sendo que o número médio de pinhões é de 11 a 60; as pinhas produzidas nos ramos secundários são

menores, mais arredondadas e com menor número de pinhões (4 a 40 por pinha) (Anselmini, 2005). Os pinhões apresentam casca de cor marrom avermelhada e polpa que corresponde à parte comestível muito dura quando crua, necessitando de um processo de abrandamento da textura para permitir o consumo (Koch e Corrêa, 2002).



Figura 10. Pinha (fruto da *Araucaria angustifolia*) contendo pinhões
Fonte: Ciflorestas (2010)

Além da importância comercial da madeira do Pinheiro do Paraná, Ribeiro (2000) citou a importância histórica do pinhão, como fonte de alimentos para as tribos indígenas caçadores-coletores-pescadores. Após a coleta, a semente era desidratada para posterior consumo, e, quando consumida, era diretamente assada no borrinho, cozida ou transformada em farinha, com a qual eram feitos diversos produtos (Wosiacki, 1984). Ainda hoje, o pinhão, constitui um dos alimentos tradicionais de alto teor calórico consumido cozido ou assado, principalmente durante o inverno durante os meses de safra (maio a agosto). Estudos recentes tentaram dar a esta semente outras utilidades, como matéria-prima para elaboração de novos produtos, tais como, misturas para sopa, suflê, bolos e biscoitos (Cladera-Oliveira, 2008).

Cladera-Oliveira (2008) verificou a estabilidade do pinhão em diferentes temperaturas de armazenamento (25,5 e -18°C) e constatou que a 25°C o pinhão pode ser armazenado por apenas 5 dias, a 5°C (temperatura de refrigeração) por 3 meses e a -18°C (congelamento) por 8 meses no mínimo. No referido trabalho foi constatado que a vida de prateleira desta semente foi afetada principalmente pelo desenvolvimento de fungos e pela germinação da mesma, fato que pode ser explicado pela alta umidade e atividade de água.

Conforme Cordenunsi *et al.*(2004) o pinhão é considerado uma fonte de amido, devido á presença de uma alta quantidade (~34%) deste componente, além disso possui um baixo conteúdo de proteínas (~3,57%) e lipídios (~1,26%). Na Tabela 3 está apresentada a composição físico-química do pinhão cru e cozido determinada por esses autores.

Tabela 3. Composição físico-química do pinhão cru e cozido.

Análise (% b.u. *)	Pinhão cru	Pinhão cozido
Umidade	49,50±0,02	50,35±0,71
Proteína	3,57±0,05	2,31±0,05
Lipídios	1,26±0,07	1,26±0,09
Resíduo mineral fixo	1,60±0,01	1,41±0,02
Amido	36,28±0,11	34,48±0,72
Fibra dietética solúvel	0,63±0,13	0,55±0,18
Fibra dietética insolúvel	4,26±0,20	5,17±0,25
Açúcares solúveis totais	2,43	0,64

*b.u., base úmida

Fonte: Cordenunsi *et al.* (2004)

3.2.4 Amidos modificados

Uma das aplicações mais recentes do amido na indústria de alimentos é como agente encapsulante, ou seja, ele serve como suporte para outros materiais(Constant, 2002). O maior obstáculo para o uso do amido como agente encapsulante era sua susceptibilidade ao escurecimento (reação de Maillard) durante o procedimento de encapsulação, resultando em sabor, cor e aroma inaceitáveis, além de apresentarem uma elevada viscosidade; modificações dos amidos e dos processos permitiram eliminar esses problemas (Thomas e Atweel, 1999).

As técnicas de modificação proporcionam melhoras específicas nas propriedades dos amidos como alteração das características de cozimento (gelatinização), diminuição da retrogradação, redução da tendência das pastas em formarem géis, aumento da estabilidade das pastas ao resfriamento e congelamento, aumento da transparência e redução da viscosidade das pastas e géis, melhorias na formação de filmes, aumento da adesividade, introdução de poder emulsificante entre outros (Bemiller, 1997; Fennema, 2000).

Conforme Singh *et al.* (2007), existem diferentes técnicas de modificação que podem ser divididas em químicas, físicas ou enzimáticas e também através de processos

combinados. Cada tipo de modificação resulta em amidos com diferentes características, logo a técnica utilizada deve ser escolhida de acordo com o propósito esperado. Kosaraju (2005) destacou a utilização de amidos modificados como agentes encapsulantes via esterificação, eterificação ou acidificação, acetilação e succinilação ou carboximetilação.

Para Cardello e Celestino (1996) e Shaidi e Han (1993), os agentes encapsulantes mais utilizados são amidos modificados por ação de ácidos fracos ou enzimas específicas, originando dextrinas ou ciclodextrinas, por inclusão de grupamentos lipófilos ou pela oxidação do amido através de periodato de sódio. Conforme Azeredo (2005), aromas podem ser encapsulados com amidos modificados quimicamente por meio de hidrólise parcial seguida da reação com um componente hidrofóbico. Com isso, o amido é atraído para a interface óleo-água de uma emulsão e o polímero produzido tem boa solubilidade em água e excelente retenção.

Amidos derivados de reações com grupos lipofílicos como *1-octenil succinato*, conhecidos como amidos emulsificantes são utilizados como agentes encapsulantes, pois apresentam excelentes propriedades emulsificantes, porém exibem pobre proteção de *flavors* contra oxidação (Reineccius, 1988 apud Azeredo, 2005). Por sua vez, os amidos hidrolisados apresentam a vantagem de ter um baixo custo e conferir boa proteção contra oxidação ao material de núcleo (Wagner e Warthesen, 1995), entretanto há um problema associado ao uso desse tipo de amido que corresponde à falta de propriedades emulsificantes (Porrarud e Pranee, 2010).

Muitas pesquisas têm utilizado amidos hidrolisados em conjunto com outros materiais de parede como gelatina (Cardoso *et al.*, 2001), proteínas do soro (Sheu e Rosenberge, 1995) e emulsificante tween 80 (Barbosa *et al.* 2005) para melhorar suas características emulsificantes.

3.2.5 *Amido modificado via hidrólise ácida*

O amido, em seu estado nativo, é insolúvel em água fria, entretanto, quando uma dispersão aquosa de amido sofre aquecimento suficiente para romper os grânulos, forma-se uma pasta capaz de produzir filmes com boas propriedades mecânicas. Por outro lado, a viscosidade das soluções de amido é geralmente alta demais para a maior parte dos processos de encapsulação, como por exemplo, a atomização (Azeredo, 2005).

Para reduzir a viscosidade do amido e aumentar sua solubilidade em água, é feita a hidrólise parcial do amido (Fennema, 2000).

Os amidos tratados pela hidrólise ácida são chamados de amidos modificados por ácidos ou amidos de cocção rápida e são produzidos quando uma suspensão concentrada de amido (30-40g/100g sólidos) é tratada com ácido a temperaturas menores que a de gelatinização (30-60°C), durante um tempo de reação. O amido hidrolisado, parcial ou totalmente, forma polissacarídeos de menor massa molar, oligossacarídeos e, finalmente, unidades de *D*-glicose, o que gera a redução de viscosidade das pastas e géis formados com este tipo de amido (Bobbio e Bobbio, 2003).

Os ácidos minerais, comumente usados, são os ácidos clorídrico e sulfúrico (Fennema, 2000). Os amidos tratados por esta técnica possuem menor massa molar e, conseqüentemente, maior conteúdo de grupos aldeídos livres, menor viscosidade, maior solubilidade em água quente, menor sinerese (Whistler e Daniel, 1990), menor afinidade com iodo e maior temperatura de gelatinização (Radley, 1976). No entanto, quando modificado por ácido, o amido não apresenta mudanças significativas na sua forma granular, tem birrefringência similar e essencialmente, a mesma insolubilidade em água fria, em relação ao amido nativo (Donovan e Berkeley, 1980).

A hidrólise do amido depende da consistência do grânulo, acidez do meio, temperatura e duração da reação (Barros *et al.*, 1984). A reação de hidrólise inicia pela ação do ácido sobre a região amorfa do grânulo, que é mais suscetível à degradação, após essa etapa, que ocorre rapidamente, a região cristalina é atacada, com velocidade de reação muito mais lenta (French, 1973).

Maltodextrinas são formadas pela hidrólise incompleta de dispersões de amido de milho, tanto com ácidos quanto com enzimas. Essas são classificadas de acordo com sua dextrose equivalente (DE); a DE é relacionada ao grau de polimerização (DP) através da seguinte equação: $DE = 100/DP$ (DE e DP são valores médios para uma população de moléculas). Assim, a DE de um produto de hidrólise equivale ao seu poder redutor, como uma porcentagem do poder redutor da dextrose pura (*D*-glicose), sendo então inversamente relacionada a sua massa molar média (Fennema, 2000).

Maltodextrinas são definidas como os produtos com valores de DE menores que 20. Esses produtos são menos higroscópicos, não apresentam doçura, além de serem excelentes para contribuir com o corpo de sistemas alimentícios. A hidrólise do amido a valores de DE entre 20-60 resulta em uma mistura de moléculas que quando seca é denominada xarope de milho sólido. Estes produtos apresentam maior capacidade de absorver umidade, dissolvem-se rapidamente e são levemente doces (Fennema, 2000). Com o aumento da DE, a umidade relativa na qual um pó permanece solto é significativamente menor. Isto significa que com uma maltodextrina com alta DE é mais provável acontecer colapso do que com uma maltodextrina com baixa DE, sob as mesmas condições ambientais (Qi e Xu, 1999; Kenyon e Anderson, 1998).

A habilidade dos amidos hidrolisados protegerem materiais encapsulados contra oxidação é atribuída à sua capacidade de formar filme, às suas propriedades plásticas, e ao seu poder redutor. A plasticidade previne a quebra da matriz de proteção, que pode tornar o ingrediente suscetível ao oxigênio e o alto poder redutor, presume-se, diminui a oxidação do flavor encapsulado (Qi e Xu, 1999). Uma das grandes vantagens dos hidrolisados de amido em relação a outros materiais de parede, como a goma arábica por exemplo, é a baixa viscosidade. Enquanto uma solução de hidrolisado de amido na concentração de 30% e com DE entre 10 e 36 apresenta viscosidade de 15 a 30 mPa.s, uma solução de goma arábica, na mesma concentração, apresenta viscosidade de 500 mPa.s (Murray e Luft, 1973). A Tabela 4 apresenta algumas características do amido de milho e seus hidrolisados.

Tabela 4. Características do amido de milho e seus hidrolisados em relação aos seguintes parâmetros: higroscopicidade, poder edulcorante, solubilidade, viscosidade e retenção de voláteis.

Propriedade	Amido	Maltodextrina	Xarope de milho	Dextrose
	0	5 10 15 20 25	36 42	100
Higroscopicidade	diminui	→		umenta
Poder edulcorante	diminui	→		umenta
Solubilidade	diminui	→		umenta
Viscosidade	umenta	←		diminui
Retenção de voláteis	diminui	→		umenta

Fonte: Adaptado de Murray e Luft (1973).

3.2.6 *Uso do amido como agente encapsulante*

Conforme citado anteriormente Wagner e Warthesen (1995), Desobry *et al.* (1997), Cai e Corke (1999), Desobry *et al.* (1999), Matioli e Rodriguez-Amaya (2003); Loksuan (2007) utilizaram amido e seus derivados para encapsular pigmentos carotenóides. Além da encapsulação desses compostos, o amido também foi utilizado para outros fins (Chattopadhyaya *et al.*, 1998; Ascheri *et al.*, 2003; Krishnan *et al.*, 2005; Karathanos *et al.*, 2007; Murúa-Pagola *et al.*, 2009).

Ascheri *et al.* (2003) encapsularam óleo essencial de laranja pela técnica de *spray drying*, comparando agentes microencapsulantes contendo diferentes concentrações de *Capsul* (amido modificado comercial), goma arábica e maltodextrina. As cápsulas preparadas com 10% de capsul e 0% de goma apresentaram melhores resultados, visto que a retenção do óleo foi maior e a microscopia das amostras detectou formas mais definidas e compactas com a presença mínima de fissuras e orifícios.

Krishnan *et al.* (2005) avaliaram misturas binárias e ternárias de amido de milho comercial modificado através de ligações com octenil succinato, goma arábica e maltodextrina para encapsular óleo de cardamomo. Após seis semanas, a mistura contendo goma arábica: maltodextrina: amido modificado (4/6:1/6:1/6) ofereceu melhor proteção ao óleo, além disso a esfericidade e ausência de dentes na superfície das amostras confirmam a eficiência da mistura para encapsulação.

Amidos oxidados de milho e de amaranto foram utilizados por Chattopadhyaya *et al.* (1998) para encapsular vanilina, em substituição à goma arábica e ao *Amiogum 688* (conhecido substituto da goma arábica). Os resultados mostraram pequenas diferenças entre os agentes encapsulantes, quanto a quantidade de aroma encapsulado, porém os amidos oxidados apresentaram menor higroscopicidade durante a secagem por *spray drying*.

Karathanos *et al.* (2007) estudaram complexos de inclusão da vanilina em β -ciclodextrinas (amidos que sofreram modificação enzimática) através da liofilização. Observaram que a solubilidade do composto encapsulado aumentou e que a β -ciclodextrina protegeu a vanilina da oxidação, como mostraram os estudos oxidativos de DSC.

Murúa-Pagola *et al.* (2009) estudaram diferentes modificações químicas do amido conhecidas como succinilação, acetilação e fosforilação seguidas pela extrusão reativa. Esses autores constataram que os amidos modificados apresentaram maior solubilidade e melhores características de viscosidade do que o amido nativo e hidrolisado de milho. A técnica da succinilação apresentou boa capacidade emulsificante e maior retenção do óleo essencial de laranja devido à inclusão das cadeias hidrofóbicas.

Cardoso *et al.* (2001) obtiveram microcápsulas de amido de arroz e gelatina como material ligante através da atomização. As mesmas foram preenchidas por adsorção com óleo de peixe comercial. A fim de aumentar o grau de proteção e controlar a liberação do conteúdo das cápsulas, os autores recobriram as cápsulas com gelatina e pectina de baixo teor de esterificação e cloreto de cálcio, em um sistema de leito fluidizado. Os maiores rendimentos obtidos foram para cobertura com gelatina, porém todas as amostras apresentaram elevadas porcentagens de óleo retido, com variação entre 83,8 e 88,9%. Apesar disso, os autores afirmaram que o sistema de recobrimento por leito fluidizado não é adequado para recheios suscetíveis à oxidação, considerando o suporte utilizado. No entanto, este tipo de suporte poderia ser otimizado para outros recheios menos suscetíveis à presença de oxigênio.

3.2.7 *Gelatina*

A gelatina é uma proteína hidrossolúvel de alta massa molar, pobre em tirosina, cistina e metionina, apresenta completa ausência de aminoácidos sulfurados, porém possui elevado conteúdo de glicina, prolina e hidroxiprolina. Essa proteína é obtida pela hidrólise parcial do colágeno que é o principal constituinte das cartilagens e outros tecidos conectivos. Além da solubilização do colágeno em meios ácidos (3,0-4,0), esse composto também é convertido em gelatina por meio de aquecimento prolongado (Sgarbieri, 1996).

A gelatina possui uma grande habilidade de ligação com a água e suas cadeias de configuração helicoidal são importantes para a formação de gel, que é uma propriedade importante dessa proteína. Por ser um hidrocolóide de origem proteica possui caráter anfótero, associado à presença de grupos amina e carboxílicos nos aminoácidos.

Considerando-se a forma e tamanho da molécula de gelatina, uma outra propriedade importante é o ponto isoelétrico que, por definição, é o pH da solução de proteína em que não há migração para um campo elétrico. O ponto isoelétrico varia em função da obtenção da gelatina, sendo em torno de 7,0 a 9,4 para gelatinas do tipo A (pré-tratamento de hidrólise com pH ácido) e entre 4,5 e 5,3 para as do tipo B (pré-tratamento alcalino) (Imeson *et al.*, 1997).

Observa-se um aumento da utilização da gelatina ao longo dos anos nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos. Na indústria de alimentos, ela é utilizada como um ingrediente para aumentar a estabilidade dos produtos, sendo então imprescindível que a mesma apresente boas propriedades reológicas (Choi e Regenstein, 2000). Trata-se também de um importante material de parede, pois ele é atóxico, barato e apresenta boa capacidade de formação de géis e filmes termoreversíveis, sendo utilizada para a produção de microcápsulas por diversas técnicas (Shahidi e Han, 1993; Cardoso *et al.*, 2001; Bruschi *et al.*, 2003).

3.3 Material de recheio

Diversos tipos de ingredientes podem ser encapsulados entre eles: aromatizantes (Bertolini *et al.*, 2001; Bhandari *et al.*, 2001; Reineccius, 2004; Tobitsuka *et al.*, 2006; Karathanos *et al.*, 2007) lipídios (Kapusniak e Tomasik, 2006), microrganismos (Hansen *et al.*, 2002; 2006; Chen *et al.*, 2006) corantes (Krishnan *et al.*, 2005; Vaidya *et al.*, 2006; Shaikh *et al.*, 2006), vitaminas e minerais (Madziva *et al.*, 2005; Wegmuller *et al.*, 2006; Righetto e Netto, 2006) enzimas (Azarnia *et al.*, 2006; Kaliasapathy e Lam, 2005) ácidos, bases, edulcorantes, antioxidantes, aminoácidos, entre outros (Shaidi e Han, 1993). Na Tabela 5 está descrito com maiores detalhes a importância da encapsulação de alguns materiais.

Tabela 5. Importância da encapsulação de alguns ingredientes utilizados na indústria de alimentos.

Tipo de ingrediente	Propriedades esperadas pela microencapsulação
Aromatizantes	Prevenir a oxidação, a volatilização e a aglomeração; possibilitar a liberação controlada e a conversão de aromas líquidos em sólidos.
Ácidos e bases	Evitar oxidação e permitir a dissolução em temperaturas específicas.
Lipídios	Diminuir a susceptibilidade à oxidação.
Enzimas	Manter a integridade estérica; acelerar o tempo de maturação.
Microrganismos	Aumentar a produtividade em reatores; possibilitar a reutilização da cultura; proteger contra a presença de oxigênio, temperaturas baixas, meios ácidos e básicos; aumentar a estabilidade durante fermentação, processamento e estocagem.
Edulcorantes	Diminuir higroscopicidade; aumentar a fluidez, resistência a altas temperaturas e prolongar sensação de doçura.
Corantes	Proteger contra oxidação; permitir a solubilização em alimentos.
Vitaminas e minerais	Aumentar a estabilidade; mascarar possíveis sabores estranhos; evitar possíveis alterações de cor; permitir liberação controlada no trato gastrointestinal.

Fonte: Jackson e Lee (1991); Bertolini *et al.* (2001); Matsumoto (2001); Santos *et al.* (2001); Kumar, (2007).

3.3.1 Carotenóides

Os pigmentos carotenóides compõem um grupo de compostos amplamente distribuídos na natureza e são responsáveis pela coloração amarela, laranja e vermelha de frutos e vegetais (Coultate, 2004). A fonte clássica de carotenóides corresponde às plantas, porém eles podem ser encontrados em animais e microrganismos (Oliver, 2000). Conforme Fennema (2000), fontes notáveis são tomates (licopeno), cenouras (α e β -carotenos), pimentas vermelhas (capsantina), abóboras e morangas (β -caroteno), milho (luteína e zeaxantina) e batata-doce (α -caroteno). Cabe ressaltar que todos os vegetais folhosos verdes contêm carotenóides, mas sua cor é mascarada pela clorofila verde, que é o pigmento dominante.

Estima-se que a produção terrestre anual de biomassa de carotenóides seja de 100 milhões de toneladas, sendo que a maioria desses pigmentos é biossintetizada por populações de algas oceânicas. Muitos fatores influenciam no teor desses pigmentos

das plantas, como, por exemplo, estágios de maturidade do vegetal, exposição à luz, clima durante o desenvolvimento do vegetal, os pesticidas e adubos utilizados e o tipo de solo (Fennema, 2000).

O principal papel dos carotenóides na dieta dos seres humanos e de outros animais é sua capacidade de atuarem como precursores da vitamina A; para tanto é necessária a existência da estrutura retinóide (com o anel de β -ionona). Estima-se que os carotenóides pró-vitamínicos A presentes em frutas e vegetais forneçam de 30 a 100% da exigência de vitamina das populações humanas, sendo o β -caroteno o carotenóide que apresenta a maior atividade de pró-vitamina A (Fennema, 2000).

3.3.1.1 Estrutura

Os carotenóides são compostos lipossolúveis, polisoprenóides e podem ser divididos em dois grupos principais: carotenos ou carotenóides hidrocarbonetos compostos apenas por átomos de carbono e hidrogênio, e xantofilas que são derivados oxigenados de hidrocarbonetos que contêm pelo menos uma função de oxigênio, como hidróxi, ceto, epóxi, metóxi ou grupos ácidos carboxílicos como mostra a Figura 11 (Quirós, 2006).

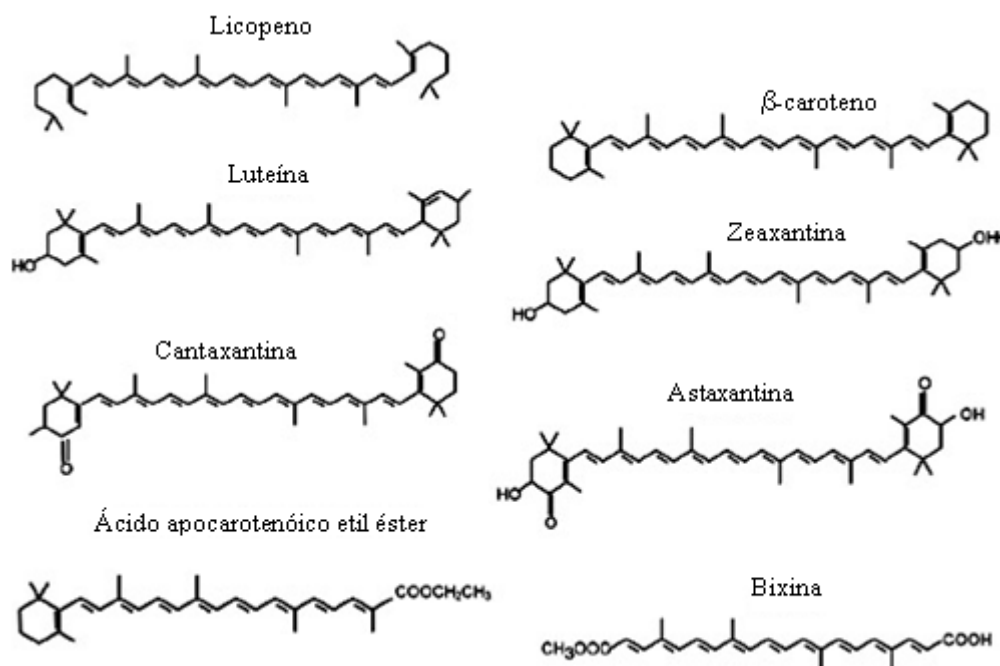


Figura 11. Estrutura química de alguns carotenóides
Fonte: adaptado de Fontana *et al.* (2000).

A base estrutural da espinha dorsal do carotenóide é constituída por unidades de isopreno ligadas covalentemente na forma cabeça-cauda ou cauda-cauda, para que se crie uma molécula simétrica. Alguns carotenóides são derivados dessa estrutura primária de 40 carbonos, outras estruturas contêm grupos cíclicos terminais, enquanto outros possuem apenas uma ou nenhuma ciclização como o licopeno. Além disso, outros carotenóides podem ter o esqueleto carbônico mais curto, sendo conhecidos como apocarotenais (como a bixina) (Fennema, 2000).

A principal característica estrutural dos carotenos é um sistema de ligações duplas conjugadas que constitui o cromóforo responsável pelo poder corante e, também, pelo seu efeito protetor contra diversas doenças crônicas, como câncer, catarata, degeneração macular, esclerose múltipla e aterosclerose (Wong, 1995; Edge e Mcgarve, 1997; Kristal, 2004). Segundo Aggarwal e Shishodia (2006) estudos epidemiológicos recomendam o consumo de frutas e vegetais para prevenção de câncer e de outras doenças, mas seus compostos ativos, em nível molecular, e seus mecanismos de ação ainda não são bem entendidos. Duas teorias explicam o poder dos carotenóides em evitar algumas doenças, a primeira corresponde à atividade pró-vitáminica A, e a segunda é que os carotenóides possuem ação antioxidante (Edge e Mcgarve, 1997).

Sabe-se que a ação antioxidante dos carotenóides ocorre em função do número de ligações duplas conjugadas, que influenciam diretamente na desativação dos radicais livres degenerativos e também por sua habilidade em reter como armadilha os radicais peróxil (ROO[•]), gerados durante a peroxidação de lipídios (Anderson, 1996).

Os radicais livres representam qualquer espécie química (átomo e molécula com elétron desemparelhado) produzida continuamente, durante os processos metabólicos, que atuam como mediadores para a transferência de elétrons, em várias reações bioquímicas, desempenhando importantes funções no metabolismo. Os radicais livres têm como principais fontes as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, nitrogênio e o cloro, gerando uma grande quantidade de metabólitos (Mendez Filho, 1997 apud Shami e Moreira, 2004), ou seja, o termo radical livre é usualmente empregado para nomear espécies químicas contendo um ou mais elétrons não emparelhados, nos orbitais externos. Esta situação de instabilidade eletrônica torna os radicais livres altamente reativos, sendo capazes de reagir com qualquer composto

próximo à sua órbita externa, passando assim, a atuarem como oxidantes ou redutores (Halliwell e Gutteridge, 1999 apud Shami & Moreira, 2004).

Dentre os radicais livres estão incluídos: dióxido de nitrogênio (NO₂), o óxido nítrico (NO), o hidroperóxido (HO₂), a hidroxila (OH), o superóxido (O₂⁻) e o oxigênio singleto (¹O₂) (Bianchi e Antunes, 1999). Dentre os radicais anteriormente citados a hidroxila é considerada a mais reativa, levando a lesões nas células. Já o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) apesar de não ser um radical livre, é capaz de atravessar a membrana nuclear e causar danos à molécula do DNA (Anderson, 1996). O oxigênio singleto pode ser produzido na presença de oxigênio molecular, fotossensibilizadores e de luz, os carotenóides são conhecidos por desativar o oxigênio singleto, proporcionando, dessa forma, proteção contra danos oxidativos celulares. Dentre os carotenóides, o licopeno tem maior capacidade de sequestrar o oxigênio singleto, sendo duas vezes maior que o β-caroteno e dez vezes melhor que o α-tocoferol (Di Mascio, 1991).

Há pelo menos três possíveis mecanismos para a reação dos carotenóides com espécies de radicais (Krinsky e Yeum, 2003). Elas incluem, (a) formação de aduto, (b) transferência de elétrons para o radical, ou (c) abstração de hidrogênio alílico. Estes três mecanismos serão discutidos brevemente a seguir.

(a) Adição de radical - formação de aduto: reações em que um radical peroxil (ROO·) pode adicionar-se a qualquer lugar da cadeia de um carotenóide, resultando na formação de um radical de carbono-centrado (ROO-CAR·) (Krinsky e Yeum, 2003). A reação proposta está apresentada pela seguinte equação (1):

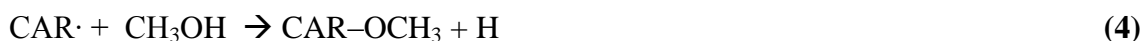


(b) Transferência de elétrons: reações que resultam tanto na formação de um radical carotenóide, como o cátion radical (CAR⁺·) e o ânion radical (CAR⁻·), ou na formação de um radical alquil (CAR·). Quando, por exemplo, o licopeno reage com o radical superóxido (O₂⁻), ocorre a transferência de elétrons com a formação do ânion radical, CAR⁻·, como mostrado na equação (2) (Krinsky e Yeum, 2003):



(c) Abstração de hidrogênio: este tipo de reação foi sugerida por Woodall *et al.* (1997) apud Krinsky e Yeum (2003), que observaram a formação de 4-metoxi e 4,4- dimetoxi,

derivados do β -caroteno quando este reagiu com os radicais iniciadores AIBN (2,2-azobis-isobutironitrila) e AMVN (2,2'- azo-bis (2,4-dimetil-valeronitrila)), na presença de pequenas quantidades de metanol. As reações propostas estão apresentadas nas reações (3) e (4).



3.3.1.2 Estabilidade e degradação

Os carotenóides são, geralmente, estáveis nos seus ambientes naturais, possuindo estrutura *all-trans*, porém quando submetidos à luz, ácidos e ao calor, pode ocorrer a perda ou degradação dos mesmos, tornando-os mais lábeis. Além disso, pode ocorrer perda da intensidade da cor (Coulate, 2004). A perda ou alteração de carotenóides durante o processamento e estocagem pode ocorrer via remoção física e, pelo fato de serem compostos altamente insaturados, por isomerização geométrica e oxidação enzimática e não-enzimática (Rodriguez-Amaya, 1999; Coulate, 2004).

Os carotenóides são degradados principalmente pela oxidação enzimática e não enzimática, as quais dependem da disponibilidade do oxigênio e da estrutura do carotenóide. Ela é estimulada pela presença de luz, calor, metais, enzimas e peróxidos e é inibida pelos antioxidantes. Sabe-se que a degradação oxidativa é incrementada com a destruição das estruturas celulares do alimento, aumento da porosidade ou área superficial da matriz, duração da estocagem, permeabilidade ao oxigênio e transmissibilidade à luz da embalagem. A oxidação não enzimática normalmente se caracteriza por uma fase *lag*, seguida de um desaparecimento rápido dos carotenóides, coerente com um mecanismo de radicais livres (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2008).

Os produtos de degradação são muito complexos, sendo que os mesmos foram caracterizados para o β -caroteno durante a oxidação e tratamentos térmicos. Durante a oxidação, epóxidos e compostos carbonílicos são formados inicialmente. Grandes oxidações resultam na formação de cadeias curtas de compostos mono e dioxigenados, incluindo compostos epóxi- β -ionona. Em geral, os epóxidos formam-se dentro do anel final, embora possa ocorrer cisão oxidativa para diversos sítios ao longo da cadeia. Auto oxidações grandes resultarão no clareamento dos carotenóides e na perda de sua cor

(Fennema, 2000). A atividade enzimática, em especial de lipoxigenase, acelera a degradação oxidativa dos carotenóides, isso ocorre, devido à oxidação de ácidos graxos insaturados catalisada pela lipoxigenase para produzir peróxidos que reagem com os carotenóides (Fennema, 2000).

Geralmente, a oxidação dos carotenóides ocorre acompanhada de isomerização, sendo que tanto os *cis* quanto os *trans* isômeros estão sujeitos à oxidação (Figura 12). Os estágios iniciais da oxidação envolvem epoxidação e clivagem com formação de apocarotenóides. As fragmentações subsequentes resultam em compostos de baixa massa molar, semelhantes àqueles produzidos pela oxidação dos ácidos graxos. Agora, desprovidos de cor ou atividade biológica conhecida, estes compostos podem dar origem a sabores desejáveis ou sabores estranhos indesejáveis (Rodríguez-Amaya *et al.*, 2008).

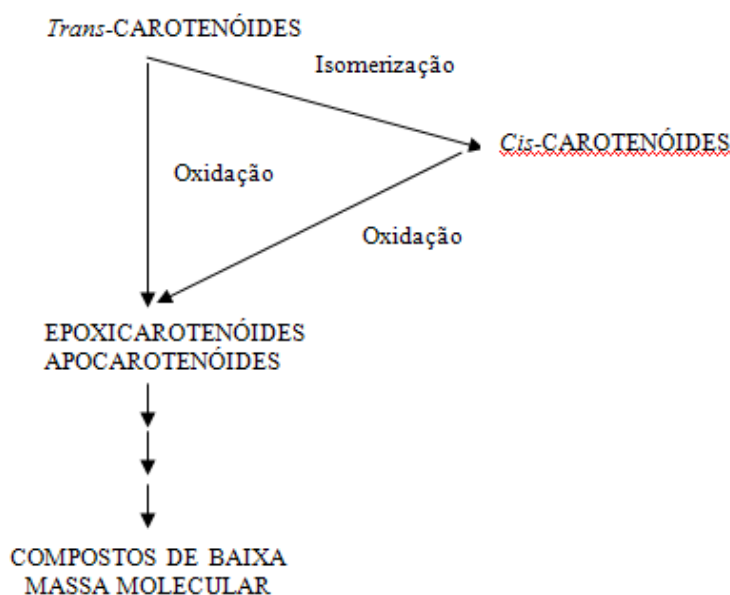


Figura 12. Esquema de degradação de carotenóides a compostos de baixa massa molar.
Fonte: Rodríguez-Amaya (1999).

As reações de isomerização são induzidas com facilidade por tratamentos térmicos, exposição a solventes orgânicos, contato por períodos prolongados com determinadas superfícies ativas, tratamento com ácidos e iluminação das soluções. Teoricamente, um grande número de configurações geométricas possíveis pode resultar da isomerização, em decorrência da alta quantidade de ligações duplas presentes. O beta-caroteno tem, potencialmente, 272 formas *cis* diferentes, porém devido ao

impedimento estérico, apenas um número limitado pode ter ocorrência. A isomerização afeta a atividade de pró-vitamina A, apesar de não afetar a cor dos carotenóides. A atividade pró-vitáminica A dos isômeros *cis* do β -caroteno varia, dependendo da forma isomérica, de 13 a 53% quando em comparação a configuração *all-trans* (Fennema, 2000).

Quando submetidos a temperaturas elevadas (ao redor de 190°C), os carotenóides formam produtos de degradação como o ioneno, tolueno, m-xileno e 2,6-dimetilnaftaleno, ou seja, perdem totalmente suas características (Wong, 1995), no entanto, o branqueamento é conhecido por influenciar o conteúdo de carotenóides devido à inativação da lipoxigenase. Já o congelamento gera poucas mudanças no seu conteúdo (Fennema, 2000).

A homogeneização física intensa e os tratamentos térmicos também aumentam a extração e a biodisponibilidade, quando há consumo. No caso de extrusão e de alta temperatura de aquecimento de óleos, ocorrerá apenas a isomerização dos carotenóides, bem como a degradação térmica. Temperaturas muito elevadas podem gerar produtos de fragmentação voláteis. No caso do β -caroteno os produtos de aquecimento intenso, na presença de ar, são semelhantes aos que decorrem da oxidação (Fennema, 2000).

3.3.1.3 β - caroteno

O β -caroteno é um importante membro da família dos carotenóides, encontrado em muitas frutas e vegetais (cenoura, batata-doce, abóbora, mamão papaia, manga, carambola, pêssigo, espinafre, brócolis, couve e chicória) (Kandlakunta *et al.*, 2008). As frutas palmáceas buriti, tucumã, bocaiúva, bacuri e umari também são ricas fontes de β -caroteno, sendo que o buriti é o produto alimentar detentor da maior concentração conhecida de β -caroteno dentro da vasta gama já analisada de alimentos brasileiros (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2008).

A sua estrutura molecular básica é composta de oito unidades isoprenóides, que contém quarenta átomos de carbonos e dois anéis no final da cadeia de duplas ligações conjugadas (Figura 13), sendo a longa cadeia conjugada responsável pela coloração alaranjada (Ribeiro *et al.*, 2008).

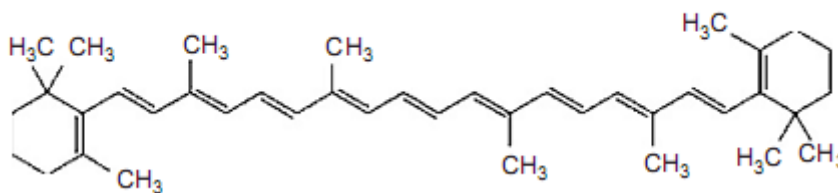


Figura 13. Estrutura química do β -caroteno ($C_{40}H_{56}$)

Fonte: Coultate (2004).

Teoricamente este carotenóide possui atividade pró-vitáminica A (Desobry *et al.*, 1997), sendo convertido em vitamina A (retinol) e ácido retinóico no corpo humano. Na sua maior parte, esta conversão processa-se nos intestinos e no fígado (Henriques *et al.*, 1998). Conforme mencionado anteriormente, além de ser precursor da vitamina A, este carotenóide possui atividade antioxidante e poder de quelar radicais livres.

O *trans*- β -caroteno é o isômero predominante em muitas frutas e vegetais frescos, porém o processamento térmico pode aumentar substancialmente a proporção da forma geométrica *cis* nestes alimentos, em particular *13-cis* e *9-cis*. (Lessin, 1997).

Estereoisômeros do caroteno apresentam diferentes propriedades químicas e biológicas e diferem na sua capacidade antioxidante e biodisponibilidade (Carvalho *et al.*, 1995; Boileau *et al.*, 1999; Marx *et al.*, 2003; Rodriguez-Amaya *et al.*, 2008). Há tempos se atribui atividade vitamínica mais baixa na forma *cis*, em relação aos isômeros *trans* (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2008). Carvalho *et al.*(1995) encontraram diferenças consideráveis na atividade pró-vitamínica, sendo que o *13-mono-cis* β -caroteno possuiu 53% da atividade do *all-trans* e o *9 mono-cis*, 38%. Quanto à biodisponibilidade dos isômeros do β -caroteno pouco é conhecido. No soro humano foi encontrado largamente a forma *all-trans* com apenas pequenas quantidades de *13-cis* e *9-cis* depois da ingestão de isômeros de β -caroteno. Contudo, consideráveis quantidades de *cis* isômeros estão presentes em vários tecidos humanos e animais (Krinsky *et al.*, 1990; Stahl *et al.*, 1992). Mais recentemente, foi relatado que o *trans*- β -caroteno é preferencialmente absorvido em humanos (Gaziano *et al.*, 1995; Stahl *et al.*, 1995; Ben-Amotz e Levy, 1996), quando comparado ao *9-cis*- β -caroteno. Em contraposição, foi constatado que o *cis*-licopeno, que não possui atividade pró-vitamínica A, é mais biodisponível do que o *trans*-licopeno em animais como o furão (Boileau *et al.*, 1999).

Quanto à atividade antioxidante, autores relataram que isômeros *cis* apresentam maior poder (*in vitro* e *in vivo*), quando comparado com o isômero *all-trans* (Ben-Amotz & Levy, 1996; Levin *et al.*, 1997 apud Henriques *et al.*, 1998).

3.3.2 Microencapsulação de carotenóides

Os trabalhos que visaram a encapsulação de carotenóides verificaram que a aplicação desta técnica aumentou a estabilidade desses compostos (Desobry *et al.*, 1997; Cai e Corke 1999; Desobry *et al.*, 1999; Graciette Matioli, 2002; Matioli e Rodriguez-Amaya, 2002; Matioli e Rodriguez-Amaya, 2003; Higuera-Ciapara *et al.* 2004; Santos, Fávaro-Trindade e Grosso 2005, Shu *et al.*, 2006; Sutter *et al.*, 2006; Loksuwan 2007).

Desobry *et al.* (1999) encapsularam β -caroteno, por *spray-drying*, utilizando dois tipos de maltodextrinas (DE 15 e DE 4) adicionadas de glicose, galactose e lactose, para preparar seis maltodextrinas de composições diferentes, mas com o mesmo valor de dextrose equivalente (DE 25). Para tanto, uma maltodextrina comercial de DE 25 foi empregada como referência. A estabilidade das amostras foi avaliada estocando as mesmas em ambientes com diferentes umidades (11% e 33%) e temperaturas (25, 35 e 45°C). Neste estudo, concluiu-se que a adição de mono e dissacarídeos à maltodextrina reduziu o tamanho dos poros da rede de maltodextrina, limitando a difusão do oxigênio e protegendo o β -caroteno, visto que a meia-vida deste composto aumentou de 6 semanas para 17 semanas.

Matioli e Rodriguez-Amaya (2003) mostraram grande desempenho da γ -ciclodextrina na estabilização desse mesmo composto, pois após seis meses de testes, a cor original do composto foi mantida. Matioli e Rodriguez-Amaya (2002) estudaram a estabilidade do licopeno extraído de goiaba vermelha, encapsulado em matrizes de goma arábica e maltodextrina através da atomização e liofilização. Os autores constataram que, no segundo período de estocagem, onde a velocidade de degradação do licopeno foi menor, a diferença foi expressiva entre as duas técnicas, sendo que a liofilização apresentou maior proteção, pois o tempo de meia vida aumentou consideravelmente quando o material foi exposto à luz.

Sutter *et al.* (2006) microencapsularam β -caroteno em matriz de manitol, pela técnica da liofilização, a fim de estudar o efeito da adição de cátions divalentes e sais fosfatos a esta matriz. Os autores observaram que a presença de fosfatos diminuiu ou inibiu o processo de cristalização, ou seja, a presença de fosfatos atrasou significativamente a cristalização do manitol a uma taxa altamente satisfatória durante a secagem, aumentando o grau de encapsulação do carotenóide. Assim foi possível confirmar que é necessário manter a matriz de manitol amorfa para permitir a interação de pontes de hidrogênio entre o manitol e as proteínas ou outras biomoléculas, para garantir a estabilização das formulações liofilizadas. A adição dos cátions divalentes mostrou um efeito sinérgico, diminuindo a taxa de degradação do composto encapsulado.

Desobry *et al.* (1997) compararam a liofilização, a atomização e a secagem em tambor na microencapsulação de β -caroteno em matrizes de maltodextrina. Neste trabalho os autores constataram que a liofilização resultou em uma menor degradação do composto ativo durante o processo de secagem, porém a secagem em tambor apresentou uma maior estabilidade do composto durante a estocagem, fato atribuído a menor quantidade de carotenóide superficial e maior tamanho de partícula. Cabe ressaltar que os experimentos foram conduzidos em diferentes ambientes com umidade e temperatura controladas, sendo que a umidade não interferiu significativamente na oxidação, porém maiores diferenças entre as taxas de degradação foram encontradas entre 25 e 45°C.

Shu *et al.* (2006) mostraram que a microencapsulação de licopeno em gelatina e sacarose, por *spray drying*, pode evitar efetivamente o dano causado pelo oxigênio e luz durante o armazenamento. Os parâmetros estudados corresponderam às condições de secagem (temperatura do ar de entrada e saída do secador), à relação entre os dois materiais de parede e também à relação núcleo/agente encapsulante. Quanto aos resultados encontrados, a proporção que resultou em uma emulsão mais estável correspondeu à 1:4 (núcleo/material de parede), já a relação entre gelatina e sacarose correspondeu a 3:7 devido à viscosidade da emulsão a ser atomizada, que deve permitir a formação de partículas regulares e uma distribuição de tamanho de partículas pequena. Viscosidades muito elevadas podem causar o aumento do conteúdo de umidade dos pós, além disso, durante a secagem, pode ocorrer a rápida formação de uma crosta devido à baixa densidade das partículas. Quanto a temperatura da alimentação, foi encontrado um

valor ótimo de 55°C, pois temperaturas mais elevadas ocasionaram um acúmulo de partículas na parede da câmara e dispersaram um cheiro de queimado. Já a temperatura do ar de entrada, quando alcançou valores próximos de 210°C promoveu os mesmos problemas ocasionados pelo aumento da temperatura da alimentação, resultando em um desequilíbrio no balanço entre a taxa de evaporação da água e a formação de filmes.

Higuera-Ciapara *et al.* (2004) encapsularam astaxantina em matriz de quitosana através de uma técnica de evaporação múltipla. As condições de estocagem estudadas foram 25, 35 e 45 °C a 33% de umidade relativa. A astaxantina microencapsulada manteve-se estável durante 8 semanas, sem sofrer isomerização ou degradação de pigmentos.

Wagner e Warthesen (1995) realizaram testes com amidos hidrolisados com diferentes graus de dextrose equivalente (4, 15, 25 e 36,5) para encapsular carotenóides, o amido hidrolisado de DE 36,5 foi superior na retenção do β -caroteno durante a estocagem, porém os quatro amidos promoveram uma vida de prateleira 70-220 vezes maior que o suco de cenoura atomizado.

Cai e Corke (1999) utilizaram misturas de maltodextrinas, amido nativo de milho e amido de milho modificado (fosforilado) para encapsular betacianina. Os pós foram estocados a 25°C com 5 e 32% de umidade relativa. A 5% de umidade relativa, quanto maior o grau de dextrose, maior foi a estabilidade encontrada após 16 semanas, visto que graus de DE mais elevados promovem camadas mais densas e impermeáveis ao oxigênio. Já a 32 % de umidade, a estabilidade do encapsulado diminuiu com o acréscimo do DE, fato devido à higroscopicidade dos pós. Os amidos nativo e fosforilado mostraram menores retenções do composto, pois eles não conseguem criar um sistema de parede denso para proteger as betacianinas da oxidação.

A encapsulação da oleoresina de páprica (corante vermelho à base de carotenóides) foi estudada por Santos *et al.* (2005). Para tanto, foram utilizados como agentes encapsulantes a goma arábica e grânulos porosos de amido/gelatina. A microscopia eletrônica de varredura mostrou indícios que as microcápsulas elaboradas com goma arábica seriam mais viáveis, pois possuíam formato arredondado, com concavidades, sem poros ou rachaduras e paredes contínuas. Já as cápsulas produzidas com grânulos porosos de amido/gelatina apresentaram formato arredondado e paredes

formadas pela aglomeração dos grânulos com poros ou interstícios, que podem permitir a oxidação da oleoresina.

Loksuwan (2007) utilizou maltodextrina, amido nativo e amido ácido modificado de tapioca para encapsular β -caroteno. Neste estudo o autor verificou a quantidade total e superficial do caroteno nas microcápsulas após o processo de secagem por atomização. Foi constatado que o amido ácido modificado reteve uma porcentagem maior do composto, com uma menor concentração na superfície, indicando uma maior eficiência da microencapsulação.

Capítulo 4 - Materiais e Métodos

Neste capítulo é apresentada a metodologia empregada para realizar a produção das microcápsulas, assim como as matérias-primas, os reagentes, equipamentos e métodos de análise utilizados.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA) e no Laboratório de Tecnologia em Engenharia Química (LATEQ) do Departamento de Engenharia Química da UFRGS, no Laboratório de Reatividade e Catálise do Instituto de Química da UFRGS, no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, no Laboratório de Materiais Cerâmicos do Departamento de Engenharia de Materiais da UFRGS, e no laboratório de pós-colheita da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

4.1 Matéria-prima e reagentes

Para realizar o presente trabalho, foram utilizados pinhões da safra de 2009, adquiridos em mercado local de Porto Alegre. O pinhão foi, primeiramente, lavado com água corrente, seco à temperatura ambiente durante 24 horas e selecionado para posterior congelamento em sacos de polietileno, até o seu uso. O trans- β -caroteno em pó (pureza de aproximadamente 95%) foi obtido da Sigma Aldrich (St. Louis, USA) e os reagentes químicos foram adquiridos das empresas Nuclear (Diadema, SP, Brasil), Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil) e Dinâmica Química Contemporânea (Diadema, SP, Brasil). A gelatina foi obtida da Leiner-Davis Bloom 212.

4.2 Extração do amido de pinhão

O protocolo de extração do amido seguiu a metodologia empregada por Bello-Pérez *et al.* (2006) com algumas modificações. As sementes de pinhão foram descascadas manualmente com a ajuda de uma faca. As cascas foram retiradas junto com a película interna que recobre superficialmente o endosperma, em seguida o pinhão foi triturado em liquidificador doméstico com adição de água fria (1 kg/1,5 L). O material obtido na trituração foi filtrado através de uma peneira (Mesh Tyler 100) duas vezes. A seguir, o permeado contendo o amido foi deixado em refrigerador ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) para decantação. O amido precipitado foi lavado/decantado três vezes em água fria em intervalos de 50 minutos e seco em estufa (Tecnal, modelo TE-381, Brasil) a 40°C por 48 horas. O amido seco foi triturado em liquidificador doméstico e peneirado (Mesh Tyler 100) para obter um pó refinado. Os testes referentes à composição centesimal do amido de pinhão não foram executados, visto que na literatura diferentes autores encontraram valores similares (Bello-Pérez *et al.* 2006; Stahl *et al.* 2007; Thys, 2009).

4.3 Hidrólise do amido de pinhão

A hidrólise do amido de pinhão foi realizada conforme Mun e Shin (2006), adicionando ácido na proporção de 1:4 m/v. Para tanto, 10 g de amido foram suspensas em 40 mL de ácido e agitadas em shaker (Cientec, CT 712RN, Brasil) a 225 rpm a temperaturas inferiores à gelatinização do amido de pinhão ($\sim 47^{\circ}\text{C}$). Após a hidrólise, o pH da dispersão foi ajustado para $5,50 \pm 0,20$, com uma solução de NaOH 1M. A recuperação do amido ocorreu por meio de centrifugação (2000 rpm/ 10 min/ 25°C), lavagem com água destilada e decantação. A seguir, o amido hidrolisado foi seco em estufa (Tecnal, modelo TE-381, Brasil) a 40°C durante 48 horas a fim de atingir valores de umidade entre 10 e 15 %.

4.3.1 Testes preliminares

Testes preliminares com ácido sulfúrico e clorídrico foram realizados em diferentes tempos de reação (3, 6, 9 e 12 horas), fixando valores de concentração de ácido e temperatura em 3 mol.L^{-1} e 37°C , respectivamente. As diferenças encontradas entre o tipo de ácido e tempo de reação foram determinadas através de análise estatística (ANOVA).

4.3.2 Planejamento fatorial

Após a escolha do tempo, um Planejamento Fatorial 2^2 com repetição no ponto central foi conduzido para analisar diferentes condições de hidrólise. As variáveis independentes temperatura (x_1) e concentração de ácido (x_2) foram avaliadas em 3 níveis, codificados como -1, 0 e +1. Os níveis de temperatura e concentração de ácido são mostrados na Tabela 6. Como a hidrólise deve ocorrer a temperaturas inferiores à temperatura de gelatinização do amido, as temperaturas empregadas no planejamento não puderam exceder a 47°C (Thys, 2009). Quanto à concentração de ácido, os valores não excederam a 5 mol.L⁻¹, visto que concentrações de ácido muito elevadas podem ocasionar perdas de propriedades que são requeridas pelo processo de hidrólise, além de diminuir a porcentagem de recuperação do amido hidrolisado.

A variável de resposta avaliada estatisticamente correspondeu ao equivalente de dextrose (DE) e a Equação 5 representa o modelo polinomial utilizado para modelagem dos dados experimentais:

$$y_i = \alpha_0 + \alpha_1 x_1 + \alpha_2 x_2 + \alpha_3 x_1 x_2 \quad (5)$$

onde α_n são os coeficientes de regressão; y_i é a variável de resposta e x_1 e x_2 são as variáveis independentes, temperatura e concentração de ácido, respectivamente. Para análise dos resultados foi utilizada a metodologia de superfície de resposta através do software Statistica versão 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Tabela 6. Planejamento Fatorial 2^2 com repetição no ponto central referente à hidrólise ácida do amido de pinhão.

Tratamento	Valores codificados		Valores reais	
	x_1	x_2	Temperatura (°C)	Concentração de HCl (mol.L ⁻¹)
1	-1	-1	30	3
2	+1	-1	44	3
3	-1	+1	30	5
4	+1	+1	44	5
5	0	0	37	4
6	0	0	37	4

4.3.3 Dextrose equivalente (DE)

O sobrenadante obtido na primeira centrifugação do amido hidrolisado (item 4.3) foi ajustado a pH $7,5 \pm 0,2$ com NaOH 1 M para determinação do equivalente de dextrose através do método do ácido dinitrosalicílico (ADNS), conforme Miller (1959). Este método baseia-se na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico conforme apresentado na Figura 14, ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento de coloração laranja lida em espectrofotômetro (Pró-Análise, modelo UV-1600, Brasil) a 540 nm (Silva *et al.*, 2003). O teor de dextrose equivalente foi obtido através de uma curva padrão previamente obtida através da análise de soluções de diferentes concentrações de glicose. O equivalente de dextrose ou dextrose equivalente (DE) é um termo convencional utilizado para descrever o grau de hidrólise do amido, expresso como a porcentagem de açúcares redutores presentes (Fennema, 2000).

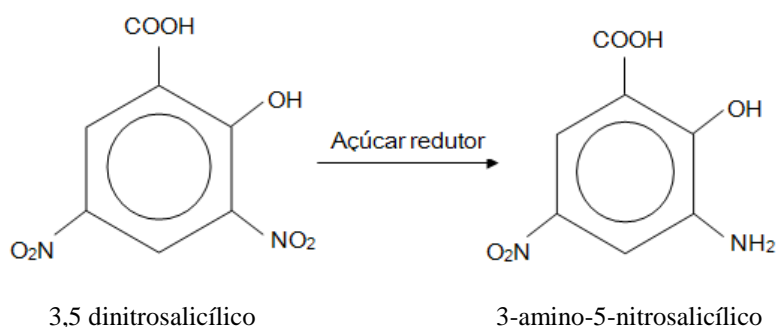


Figura 14. Reação do ácido 3,5 dinitrossalicílico com açúcar redutor
Fonte: Silva *et al.*(2003)

A preparação do reagente DNS foi feita conforme Miller (1959) com algumas modificações, para tanto 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico foram dissolvidas em 200 mL de NaOH 2 M através de aquecimento e agitação vigorosa (solução A). Outra solução foi preparada dissolvendo 300 g de tartarato de sódio e potássio em 500 mL de água destilada (solução B). O reagente final foi obtido misturando a solução A, a solução B e água destilada em uma proporção de 50:20:30, respectivamente.

4.3.4 Porcentagem de hidrólise

Os valores de dextrose equivalente (DE) encontrados foram utilizados para avaliar a porcentagem de hidrólise (H) dos hidrolisados do amido de pinhão (Robin *et al.*, 1975 apud Mun e Shin, 2006) através da Equação 6, apresentada a seguir:

$$H(\%) = \frac{ARS(g) \times 0,9}{QAT(g)} \times 100 \quad (6)$$

onde ARS , representa a quantidade de açúcar redutor do sobrenadante e QAT a quantidade de amido total no início da hidrólise.

4.4 Obtenção das microcápsulas

O amido (nativo ou hidrolisado), seco e triturado foi suspenso em água destilada (29% m/m) e aquecido em banho termostático a 100°C (Quimis, Q226M, SP, Brasil) por 7 minutos para obter uma pasta de amido gelatinizado. O trans- β -caroteno em pó foi adicionado em uma proporção 1:500 à pasta de amido resfriada, através de agitação mecânica com auxílio de um mixer, até completa homogeneização. Proporções semelhantes entre o núcleo e o material de parede foram utilizadas por outros autores ao encapsular carotenóides (Matioli e Rodriguez-Amaya, 2002; Matioli e Rodriguez-Amaya, 2003 e Loksuwan, 2007). Após o preparo das suspensões, as amostras foram congeladas em ultrafreezer (*Coldlab*, modelo CL 120-40, Brasil) a - 40°C durante 12 horas e secas por 30 horas.

A secagem das amostras não foi feita nas bandejas do equipamento de liofilização devido a pouca quantidade de produto a ser tratada. As amostras foram secas em pequenos frascos que são conectados ao equipamento através dos manifolds. Durante a secagem, os frascos foram recobertos com papel alumínio e saco preto para proteger as amostras da luz. A pressão do liofilizador (Terroni Equipamentos, modelo LS 6000, Brasil) manteve-se na faixa de 230-300 μ Hg e a temperatura do condensador permaneceu em torno de - 40°C \pm 2°C. Na Figura 15 está apresentada uma fotografia ilustrativa do liofilizador.

Para verificar o tempo necessário para realizar o processo de liofilização, testes preliminares foram feitos. Para tanto, as amostras foram pesadas de hora em hora até que atingissem peso constante, ou seja, até atingir uma umidade de equilíbrio.



Figura 15. Liofilizador utilizado na secagem das amostras.

Diferentes amostras foram elaboradas com amido nativo, amido hidrolisado, e mistura de ambos com gelatina, conforme apresentado na Tabela 7. Os valores de DE utilizados no preparo das microcápsulas correspondem aos encontrados no planejamento fatorial. As cápsulas foram feitas com amido hidrolisado de maior valor de DE (obtido conforme item 5.3 utilizando uma concentração de ácido clorídrico de 5 mol.L⁻¹ a 44°C), assim como um valor intermediário (obtido conforme item 4.3 utilizando uma concentração de ácido clorídrico de 3 mol.L⁻¹ a 44°C). O amido nativo foi utilizado como um padrão, visto que o mesmo não sofreu hidrólise.

Tabela 7. Nomenclatura das cápsulas obtidas com diferentes agentes encapsulantes.

Cápsulas	Material de parede utilizado para microencapsular o β -caroteno
A	Amido nativo ¹
AG	Amido nativo + gelatina (95:5)
B	Amido hidrolisado DE 6 ²
BG	Amido hidrolisado DE 6 + gelatina (95:5)
C	Amido hidrolisado DE 12 ³
CG	Amido hidrolisado DE 12 + gelatina (95:5)

¹Amido nativo: amido nativo obtido conforme item 4.2, seco em estufa.

²Amido 6 DE: amido com dextrose equivalente correspondente a 6 mg de glicose/ mg de solução.

³Amido 12 DE: amido com dextrose equivalente correspondente a 12 mg de glicose/ mg de solução.

4.5 Conteúdo total e superficial de β caroteno.

O conteúdo total (CT) foi calculado como a quantidade de β -caroteno presente nas micropartículas em relação ao conteúdo inicialmente utilizado na produção das mesmas, conforme Equação 7 apresentada a seguir:

$$CT (\%) = \frac{\text{beta-caroteno quantificado na amostra}}{\text{beta-caroteno adicionado na amostra}} \times 100 \quad (7)$$

Para encontrar o conteúdo total de β -caroteno encapsulado, foi seguida a metodologia de Zhou *et al.*(1994), com algumas modificações, onde 50 mg do pó foram dispersos em 2,5 mL de água e 20 mL de hexano em um tubo falcon (2,5 cm x 10 cm). O tubo foi selado e agitado a 2500 rpm por 20 minutos à temperatura ambiente em um shaker (Marconi, MA 563, SP, Brasil) até total descoloração do pó. A cor do sobrenadante contendo hexano foi medida a 454 nm em espectrofotômetro (Pró-Análise, modelo UV-1600, Brasil).

O conteúdo superficial de β -caroteno, ou seja, a quantidade de carotenóide não encapsulado, foi medido seguindo a metodologia descrita por Wagner e Warthesen, (1995) com algumas modificações, onde 50 mg do pó foram colocadas em um tubo Falcon e extraídas com 20 mL de hexano. Após 15 segundos em shaker a 100 rpm (Marconi, MA 563, SP, Brasil), as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 1 minuto (Cientec, CT 5000R, Brasil), em seguida a absorbância da solução sobrenadante foi medida em espectrofotômetro a 454 nm para determinar a concentração de carotenóide. A porcentagem de β -caroteno superficial foi determinada através da razão entre o conteúdo encontrado através desta metodologia e o conteúdo total.

A quantificação do β -caroteno, presente nas microcápsulas, realizada através da leitura em espectrofotômetro, foi quantificada através da Lei de Beer-Lambert (Cecchi, 2003) conforme a Equação 8.

$$Abs = a.b.c \quad (8)$$

onde, *Abs* é a absorbância lida a 454 nm (Apêndice C); *a* corresponde a absortividade (L. mg⁻¹.cm⁻¹) em hexano; *b* é a largura da cubeta e *c* (cm) é a concentração do composto analisado (mg. L⁻¹). A absortividade (*a*) foi encontrada através da construção

de uma curva padrão contendo pelo menos quatro concentrações diferentes e conhecidas (Cecchi, 2003), para tanto β -caroteno puro foi dissolvido em hexano (Apêndice D).

4.6 Caracterização das microcápsulas

As cápsulas foram analisadas quanto à morfologia através da Microscopia Ótica e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), tamanho de partícula, temperatura de transição vítrea, umidade e solubilidade. Os amidos nativo e hidrolisado (DE 6 e DE 12) também foram caracterizados quanto a sua morfologia, tamanho de partícula, T_g e solubilidade. Os experimentos relacionados às isothermas de sorção foram obtidos em diferentes temperaturas (10, 20 e 30°C) para as cápsulas preparadas com amido hidrolisado com DE 12.

4.6.1 Microscopia ótica

A microscopia ótica foi usada para observar os pós liofilizados e detectar a formação das microcápsulas. Para tanto os pós foram levemente dispersos em lâminas de vidro e recobertos com lamínulas, e visualizados em uma magnitude de 100 X em microscópio ótico (*Opton*, modelo TNB-04D, Brasil).

4.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A técnica da MEV foi empregada para estudar as propriedades estruturais das cápsulas, do β -caroteno e do amido utilizado como material de parede. Para tanto as amostras foram colocadas em *stubs* de 1 cm de diâmetro usando uma fita metálica dupla face de carbono e recobertas com ouro sob alto vácuo (*sputtering*). Posteriormente, as amostras foram examinadas em diferentes magnitudes em um microscópio eletrônico de varredura (Jeol Scanning Microscope JSM-6060, Tóquio, Japão), utilizando uma aceleração potencial de 5 kV durante as micrografias.

4.6.3 Determinação do conteúdo de umidade das microcápsulas

As análises de umidade foram realizadas conforme protocolo n° 925.10 da AOAC (2005). Cerca de 7 gramas de amostra foram pesadas em cápsulas de alumínio, secas em estufa a 105°C por 12 horas, resfriadas em dessecador até temperatura

ambiente por 30 minutos e finalmente pesadas. O percentual de umidade é calculado pela diferença de massa da amostra.

4.6.4 Análise granulométrica

A distribuição do tamanho de partícula das amostras de amido (nativo e hidrolisado) e das cápsulas foi determinada por um equipamento analisador de tamanho de partículas (Cilas, modelo 1180, França) que tem como princípio a difratometria laser. O equipamento utiliza três lasers para cobrir uma ampla faixa analítica de tamanhos (0,04 μm a 2500 μm), com uma ótima faixa de reprodutibilidade (precisão >99%). As amostras foram inseridas no equipamento, lentamente sob agitação constante, usando água como agente dispersor.

4.6.5 Determinação da solubilidade

O método de Eastman & Moore (1984) citado por Cano-Chauca *et al.* (2005) com algumas modificações foi usado para analisar a solubilidade em água fria (20°C) e quente (80°C) dos pós liofilizados. Um grama do pó foi misturado em 100 mL de água através de agitação magnética durante 30 minutos, logo após uma alíquota de 30 mL da solução foi centrifugada a 2600 rpm por 5 minutos, e 10 mL do sobrenadante foram evaporados em estufa a 105°C (De Leo, A3 DG Temp, Brasil). O percentual de solubilidade foi calculado pela diferença de massa do pó.

4.6.6 Temperatura de transição vítrea

Para encontrar a temperatura de transição vítrea das amostras, foi feita a análise por calorimetria diferencial de varredura (DSC 6000, Perkin Elmer, Massachusetts, USA) conforme Beninca (2008) com algumas modificações. Para tanto, as amostras foram misturadas à água destilada (proporção amostra: água de 1:4) e deixadas em repouso por pelo menos duas horas para intumescimento dos grânulos de amido. Neste período, a suspensão sofreu precipitação natural, por isso, a fim de promover a homogeneização, cada amostra foi agitada manualmente. Então, com uma micropipeta, foram inseridos 10 μl da suspensão em um microcadinho de alumínio que posteriormente foi selado. A análise DSC foi realizada nas seguintes condições:

atmosfera de ar sintético a uma vazão de 100 mL.min⁻¹ e taxa de aquecimento igual a 5°C.min⁻¹ de 20°C a 100°C.

4.6.7 Determinação das isotermas de sorção

As isotermas de sorção foram determinadas utilizando o método gravimétrico conforme Speiss e Wolf (1987) que consiste em colocar as amostras em ambientes com umidades relativas conhecidas e constantes, deixando-as até atingir o equilíbrio e determinando-se nessa condição a umidade das amostras. Para tanto, utilizaram-se soluções salinas saturadas no interior de frascos hermeticamente fechados, que, em uma dada temperatura, conferiam ao interior de cada frasco uma umidade relativa de equilíbrio conhecida. A solubilidade dos sais em água pode ser encontrada no Apêndice A.

Os sais utilizados foram: cloreto de lítio, acetato de potássio, cloreto de magnésio, carbonato de potássio, nitrito de potássio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de bário e sulfato de cobre, cujos valores de umidade relativa para cada sal a cada temperatura são apresentados na Tabela 8. Depois de preparadas, cerca de 100 mL de cada solução aquosa saturada foram colocados no interior de um frasco com fechamento hermético e capacidade de um litro. Esses frascos foram, então, colocados em estufa, por 48 horas, com a finalidade de ambientar a solução à temperatura de estudo. Após esse período, béqueres contendo as amostras foram colocados em triplicata no interior dos recipientes hermeticamente fechados. Para evitar o crescimento de fungos nos recipientes, em ambientes cuja umidade relativa era superior a 50%, foram colocados, nos seus interiores, dois pequenos frascos contendo 1mL de tolueno. Após duas semanas, as amostras foram pesadas a cada 5 dias até verificação de que não existia mudança significativa na massa (<0,0005 g) considerando que as amostras tinham chegado ao equilíbrio. Ao alcançar o equilíbrio, a umidade das amostras foi determinada. Os experimentos de sorção foram realizados nas temperaturas de 10, 20 e 30°C.

Tabela 8. Atividade de água das soluções salinas saturadas utilizadas na determinação das isotermas de sorção das microcápsulas preparadas com amido hidrolisado DE 12 em diferentes temperaturas.

Sal	10°C	20°C	30°C
LiCl	0,113	0,112	0,112
CH ₃ COOK	0,235	0,230	0,220
MgCl ₂	0,335	0,332	0,325
K ₂ CO ₃	0,440	0,430	0,430
NaNO ₂	0,675	0,655	0,635
NaCl	0,760	0,755	0,755
KCl	0,870	0,853	0,835
BaCl ₂	0,914	0,907	0,900
CuSO ₄	0,978	0,973	0,968

Fonte: Young (1976).

Os dados experimentais de sorção obtidos foram ajustados aos modelos apresentados na Tabela 2 utilizando o módulo de análises de regressão não linear do programa Statistica 7.0. (Statsoft, USA, 1995). Para avaliar a qualidade do ajuste de cada modelo, foram utilizados o coeficiente de regressão (R^2) e o erro relativo médio (ERM) definido pela Equação 9:

$$ERM = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|a_{ei} - a_{pi}|}{a_{ei}} \quad (9)$$

onde a_e e a_p são, respectivamente, os valores experimentais e preditos pelos modelos, N representa o número de pontos experimentais e m o número de parâmetros. Neste caso o a_e representa a umidade de equilíbrio experimental (X_e) e a_p a umidade de equilíbrio predita pelos modelos (X_p) (kg água.kg sólidos secos⁻¹). Geralmente, é considerado que valores de ERM menores do que 10% indicam um ajuste adequado (Lomauro *et al.*, 1985).

4.6.8 Calor isostérico e entropia diferencial de sorção

O calor isostérico de sorção Δh (J.mol⁻¹) e a entropia diferencial de sorção ΔS (J.mol⁻¹.K⁻¹) foram determinados utilizando a equação de *Clausius Clapeyron* (Eq. 10):

$$\Delta h = -R \left[\frac{\partial \ln(aw)}{\partial (1/T)} \right]_x \quad (10)$$

Linearizando a Equação 10, obtém-se a Equação 11:

$$\ln(aw)_x = \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta h}{R.T} \quad (11)$$

onde R representa a constante universal dos gases ($1,986 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ou $8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), T é a temperatura absoluta (K), aw é a atividade água e X a umidade de equilíbrio ($\text{kg água} \cdot \text{kg sólidos secos}^{-1}$). Através da análise de regressão linear obtém-se os coeficientes angular e linear representados por $\Delta h/R$, e $\Delta S/R$, respectivamente.

4.7 Estabilidade das microcápsulas

Os experimentos referentes à estabilidade do composto encapsulado nos materiais de parede estudados foram realizados em diferentes condições de estocagem, como temperatura, atmosfera e luz. Os itens a seguir explicam como esses testes foram feitos.

4.7.1 Termossensibilidade e influência do oxigênio

As amostras foram analisadas tanto em condições aeróbias (ambientais) como anaeróbias. Para as condições anaeróbicas, as amostras foram colocadas em frascos de vidro âmbar, em atmosfera de nitrogênio, fechadas com tampas de borracha, a 10 e 30°C . As cápsulas estocadas em condições aeróbias foram colocadas em frascos âmbar sem tampa, e submetidas às mesmas condições das amostras anaeróbias. As amostras foram quantificadas, semanalmente, em relação à quantidade de carotenóide conforme item 4.5, e as medições foram feitas em duplicata.

4.7.2 Fotossensibilidade

Os testes de estabilidade frente à presença de luz foram conduzidos conforme Matioli e Rodriguez-Amaya (2002). O material encapsulado foi armazenado em frascos de vidro transparente e foram expostos a quatro lâmpadas UV de 40 W com intensidade de radiação $0,286 \text{ W/m}^2$, dispostas paralelamente e suspensas a 42 cm das amostras. Os frascos contendo as amostras também foram colocados em ambiente com ausência de luz. O teste de estabilidade se estendeu por um período de 40 dias à temperatura de

25 ± 2 °C. Para quantificar a intensidade luminosa foi utilizado um radiômetro (*Cole-Parmer Instruments*, 9811, Chicago) que mede a intensidade da luz UVA a 365 nm. As amostras foram quantificadas, semanalmente, em relação à quantidade de carotenóide conforme item 4.5, e as medições foram feitas em duplicata.

4.8 Análise colorimétrica

As leituras colorimétricas das cápsulas foram feitas em um colorímetro (Minolta, modelo CR 400, Konica Minolta Sensing, Japão). A partir do espectro de refletância da amostra, obteve-se os parâmetros colorimétricos L^* , a^* e b^* da escala CIELAB determinados pela *Comission International de l'Eclairage* (CIE) (Aguilera, 1997). A coordenada L^* é uma medida de quanto mais clara ou mais escura é a amostra, com valores variando de 0 (totalmente preta) a 100 (totalmente branca). A coordenada de cromaticidade a^* pode assumir valores de -80 (verde) a +100 (vermelho) e a coordenada de cromaticidade b^* pode variar de -50 (azul) a +70 (amarelo).

O diagrama de cores do sistema CIELAB está apresentado na Figura 16. Esses parâmetros são coordenados em diagrama tridimensional, onde o encontro dos três eixos sobre um ponto do diagrama define uma cor específica.

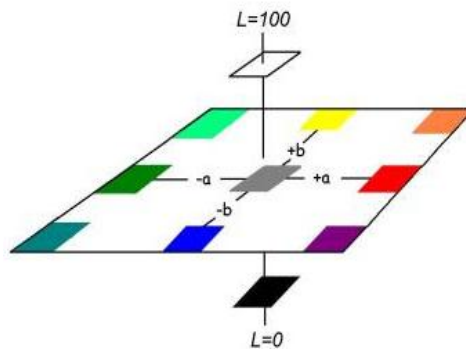


Figura 16. Diagrama representativo do sistema de cores CIELAB.
Fonte: Minolta, 1994.

As diferenças de cor foram determinadas pelo parâmetro ΔE^* , que foi calculado pela distância Euclidiana entre dois pontos em um espaço tridimensional definidos pelos parâmetros L^* , a^* e b^* . Matematicamente, o parâmetro colorimétrico ΔE^* pode ser descrito pela Equação 12:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (12)$$

Uma cor em qualquer um dos planos a^* e b^* também pode ser descrita em termos de cromaticidade ou Chroma (C^*) que é a distância de sua coordenada (a,b) origem cromática (0,0) e do seu ângulo de tonalidade, H^* , o qual é medido em graus numa escala de 0° - 360° . O H^* (ângulo de tonalidade) e o valor de Chroma (C^*) podem ser determinados a partir das Equações 13 e 14, respectivamente:

$$H^* = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (13)$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (14)$$

4.9 Modelagem cinética

As mudanças ocorridas em diferentes parâmetros de qualidade em alimentos, com o tempo, pode ser representada matematicamente pela Equação 15 (Labuza, 1982):

$$\frac{d[Q]}{dt} = \pm k [Q]^n \quad (15)$$

onde, Q representa o fator de qualidade medido; t , o tempo decorrido; k , a constante de velocidade de reação, n , a ordem de reação e dQ/dt , a taxa de mudança do fator A em função do tempo. Os sinais (+) e (-) indicam formação e degradação de qualquer parâmetro de qualidade, respectivamente.

Integrando a Eq. 15 para as condições de contorno $Q=Q_0$ quando $t=0$ e $Q=Q_t$ em um tempo t qualquer, obtém-se a Eq. 16 para $n=0$ e a Eq. 17, quando $n=1$.

$$Q_t = Q_0 - kt \quad (16)$$

$$\frac{Q_t}{Q_0} = \exp(-kt) \quad (17)$$

Para comparação dos pontos obtidos pela regressão não-linear, critérios estatísticos foram considerados. Além do coeficiente de determinação (R^2), foi utilizado outro critério estatístico, o erro relativo médio (ERM), definido anteriormente. Substituindo $Q_t/Q_0 = 0,5$ na Eq. 17, obtém-se o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) como mostra a Equação 18:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \quad (18)$$

Além dos modelos acima citados, alguns dados experimentais foram adaptados ao modelo de Weibull (Weibull, 1951), representado pela Equação 19. Esse modelo foi utilizado a fim de verificar se os dados experimentais se ajustariam a um modelo matemático diferente dos tradicionalmente empregados para modelagem de degradação de carotenóides, visto que ele é amplamente utilizado para ajustar dados de inativação térmica de enzimas bem como a degradação térmica de alguns compostos (Corradini e Peleg, 2004).

$$\frac{Q}{Q_0} = \exp(-bt^n) \quad (19)$$

onde, Q representa o fator de qualidade medido no tempo t , Q_0 o fator de qualidade no tempo zero e b e n coeficientes da equação. Cabe ressaltar que os coeficientes b e n são parâmetros dependentes da temperatura, e podem ser expressos algebricamente pelo modelo log-logístico (Corradini e Peleg, 2004) e modelos empíricos (Peleg, 2002). O modelo log-logístico é descrito conforme a Equação 20:

$$n(T); b(T) = \log_e\{1 + \exp[k'(T - T_c)]\} \quad (20)$$

onde k' e T_c são constantes. T_c marca a faixa de temperatura em que a degradação se intensifica e o k' é a aceleração do processo além de T_c .

Além do R^2 e ERM (Eq. 9) foi utilizado o qui-quadrado (χ^2) para comparar modelos matemáticos, esse parâmetro é dado pela Equação 21 a seguir:

$$\chi^2 = \frac{\sum (a_{ei} - a_{pi})^2}{(N - m)} \quad (21)$$

onde a_e e a_p são, respectivamente, os valores experimentais e preditos pelos modelos, N representa o número de pontos experimentais e m o número de parâmetros.

Os modelos cinéticos de ordem zero e de primeira ordem foram testados para ajustar os dados referentes aos parâmetros de cor e concentração de β -caroteno com o tempo de estocagem. O modelo de Weibull também foi utilizado para ajustar os dados referentes à concentração de β -caroteno com o tempo de estocagem.

4.10 Análise estatística

O modelo encontrado através do planejamento fatorial, executado conforme item 4.3.2, foi ajustado pelo método dos mínimos quadrados, e a análise de variância (ANOVA) foi realizada para testar a significância do modelo para cada parâmetro. Inicialmente, foi observada a significância da regressão pelo teste F (95% de confiança), da falta de ajuste pelo valor p e o coeficiente de determinação (R^2) que indica o ajuste do modelo.

Através da metodologia de superfície de resposta, foi avaliada a influência da temperatura e da concentração de ácido sobre o equivalente de dextrose. Foram calculados os efeitos dos fatores lineares e da interação sobre a variável de resposta, assim como o erro puro, o coeficiente t e a significância estatística (p). O valor do coeficiente p está relacionado com o nível de significância da variável independente sobre a resposta em estudo. Normalmente é escolhido como intervalo de confiança o valor de 95%. Sendo assim, pode-se afirmar que para valores de p inferiores a 0,05 a variável é considerada estatisticamente significativa. Caso contrário, é considerada não significativa. O valor t indica o quão grande é a variável em relação ao seu desvio. Assim quanto maior o valor de t , maior a probabilidade de a variável ser estatisticamente significativa.

Para verificar se as amostras testadas diferiram quanto ao conteúdo total, conteúdo superficial, tamanho de partícula, temperatura de transição vítrea e solubilidade, os resultados foram analisados estatisticamente usando a Análise de Variância (ANOVA) e o teste de diferenças entre médias (teste de Tukey com $p < 0.05$). Os valores encontrados para estes parâmetros corresponderam à média de três determinações.

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente serão apresentados os resultados relacionados à modificação do amido de pinhão via hidrólise ácida, a seguir a obtenção e a caracterização das microcápsulas, e finalmente os resultados de estabilidade do composto encapsulado.

5.1 Hidrólise do amido de pinhão

Nesta seção serão apresentados os resultados referentes à hidrólise ácida do amido de pinhão, primeiro, serão discutidos os resultados encontrados nos testes preliminares e após os valores encontrados no planejamento fatorial.

5.1.1 Estudos preliminares

Os resultados do estudo do tempo de reação de hidrólise e tipo de ácido para temperatura de 37°C e concentração de ácido de 3 mol.L⁻¹ estão apresentados na Tabela 9. As respostas correspondem ao teor de dextrose equivalente (DE), uma medida do conteúdo de açúcares redutores expresso como mg de glicose.mL de solução⁻¹ e porcentagem de hidrólise. A curva padrão para conversão da absorbância em dextrose equivalente está apresentada no Apêndice B.

Tabela 9. Valores de dextrose equivalente (DE) encontrados no estudo preliminar de tempo de reação de hidrólise a 37°C concentração de ácido de 3 mol.L⁻¹.

Teste	Ácido	Tempo (h)	DE (mg glicose.mL de solução ⁻¹)	Porcentagem de hidrólise (%)
1	HCl	3	0,22 ± 0,019 ^a	0,073 ± 0,006 ^a
2	HCl	6	1,10 ± 0,015 ^b	0,401 ± 0,005 ^b
3	HCl	9	2,49 ± 0,059 ^c	0,880 ± 0,021 ^c
4	HCl	12	4,15 ± 0,080 ^d	1,513 ± 0,029 ^d
5	H ₂ SO ₄	3	0,28 ± 0,018 ^a	0,095 ± 0,005 ^a
6	H ₂ SO ₄	6	1,14 ± 0,057 ^b	0,409 ± 0,020 ^b
7	H ₂ SO ₄	9	2,30 ± 0,023 ^c	0,827 ± 0,012 ^c
8	H ₂ SO ₄	12	3,98 ± 0,071 ^d	1,435 ± 0,026 ^d

*Média de três repetições ± desvio padrão. Letras distintas na coluna diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Através do Teste de Tukey, constatou-se que não houve diferença significativa entre os valores de DE encontrados para o ácido clorídrico e sulfúrico no mesmo tempo de reação. Nos tempos de reação de 3 e 6 horas, o valor de DE foi considerado baixo, sendo apenas em 9 horas que considerou-se uma porcentagem de hidrólise mais aceitável. A fim de alcançar valores maiores de DE, o tempo de 12 horas tornou-se o mais atrativo. Os testes seguintes referentes ao planejamento experimental foram feitos com o ácido clorídrico devido à maior facilidade de manipulação/neutralização desse reagente.

No presente trabalho optou-se por trabalhar com concentrações de ácido e temperatura mais elevadas que as comumente utilizadas, a fim de acelerar o processo de hidrólise utilizando tempos de reação mais curtos, tornando o processo mais viável.

5.1.2 Efeito da temperatura e concentração de ácido

Os resultados do planejamento fatorial 2² referentes à DE do amido de pinhão estão expostos na Tabela 10, assim como a porcentagem de hidrólise (%).

Tabela 10. Valores de dextrose equivalente (DE) e porcentagem de hidrólise do planejamento fatorial 2² referente à hidrólise do amido de pinhão.

Tratamento	Temperatura (°C)	Concentração de HCl (mol.L ⁻¹)	DE*	Porcentagem de hidrólise (%)*
1	30	3	0,86 ± 0,035	0,31 ± 0,013
2	44	3	6,53 ± 0,071	2,35 ± 0,025
3	30	5	0,95 ± 0,036	0,34 ± 0,013
4	44	5	12,37 ± 0,049	4,45 ± 0,033
5	37	4	5,61 ± 0,056	2,02 ± 0,020
6	37	4	5,58 ± 0,091	1,98 ± 0,076

*Média de três repetições ± desvio padrão.

Os valores de porcentagem de hidrólise encontrados no tratamento 4 do planejamento experimental ($x_1 = 44^\circ\text{C}$ e $x_2 = 5\text{mol.L}^{-1}$), se aproximaram dos valores encontrados por Mun e Shin (2006) que estudaram a hidrólise do amido de milho utilizando ácido clorídrico (0,1 M) a 35°C , empregando 30 dias de reação. Outros autores também estudaram a hidrólise do amido de milho, porém trabalharam com concentrações de ácido maiores (1mol.L^{-1}) e conseguiram obter uma porcentagem de hidrólise mais elevada (48 %) após o vigésimo dia de reação (Lim *et al.* 2004). Jayakody e Hoover (2002) encontraram para a mesma espécie de amido uma porcentagem de hidrólise ainda maior (73,4 %) com 15 dias de reação a 35°C , utilizando uma concentração de ácido clorídrico de $2,2\text{mol.L}^{-1}$. Como no presente trabalho, Lokuwan (2007) empregou menor tempo de processo ao hidrolisar amido de tapioca, utilizando condições de temperatura (60°C) e concentração de ácido sulfúrico (3 N) mais elevadas, porém encontrou uma porcentagem de hidrólise muito baixa (< 1%).

A magnitude dos efeitos dos fatores estimados na análise de regressão para as variáveis codificadas sobre o DE, estão apresentados na Tabela 11. Através da metodologia de superfície de resposta, constatou-se que os efeitos dos fatores lineares e da interação dos mesmos sobre a variável de resposta foram significativos, pois os valores de p encontrados foram inferiores a 0,05. Dentre os fatores, a temperatura apresentou o menor valor de p e o maior valor t , mostrando ser a variável que mais influencia no valor da DE, o que concorda com Thys (2009).

Tabela 11. Magnitude dos efeitos dos fatores estimados na análise de regressão para as variáveis codificadas sobre o DE.

Fatores	Efeito estimado	Erro puro	Valor de <i>t</i>	Valor de <i>p</i>
Interseção	5,30	0,031	167,01	0,004
x_1	8,54	0,078	109,86	0,006
x_2	2,96	0,078	38,12	0,017
x_1x_2	2,87	0,078	36,96	0,017

*significativo ($p < 0,05$)

Os valores dos efeitos estimados indicam quanto cada fator influencia na resposta estudada. Quanto maior é o seu valor, maior é a sua influência. Um efeito positivo indica que ao passar de um valor mínimo para um valor máximo da variável, a resposta aumenta. Já um efeito negativo indica o contrário. Logo, pode-se afirmar que os fatores significativos exercem um efeito positivo sobre a DE, além disso, a variável mais influente corresponde à temperatura.

A análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 12 foi realizada para avaliar a significância da regressão e a falta de ajuste do modelo completo, a um nível de confiança de 95%. Através do teste F, verificou-se que o modelo apresentou regressão significativa ($F_{\text{calculado}}$ superior ao F_{tabelado}), e através do valor de *p*, concluiu-se que falta de ajuste não foi significativo, com isso prova-se que o modelo proposto é válido para representar adequadamente o valor de DE nas condições testadas. O coeficiente de determinação (R^2) obtido para o modelo foi 0,9974, indicando que o modelo explicou 99,74% da variação dos dados observados, ou seja, o modelo de primeira ordem mostrou um ótimo ajuste. O modelo codificado proposto para apresentar a dextrose equivalente, dentro dos limites de temperatura e concentração de ácido, é representado pela Equação 21:

$$DE = 5,32 + 4,27x_1 + 1,48x_2 + 1,44x_1x_2 \quad (21)$$

Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) da regressão e da falta de ajuste para o índice de dextrose equivalente (DE).

Fonte de variação	SQ	GL	SQM	F calculado	F tabelado	Valor de <i>p</i>
Regressão	90,074	3	30,024	306,282	19,16	
Resíduo	0,196	2	0,098			
Erro puro	0,006	1	0,006	0,031		
Falta de ajuste	0,190	1	0,190			0,112*
Total	90,270	5				

*não-significativo ($p > 0,05$)

A superfície de contorno apresentada na Figura 17 mostra a variação da DE em função da temperatura e da concentração de ácido clorídrico, válida para temperatura variando de 30 a 44°C e concentração de ácido clorídrico variando de 3 a 5 mol.L⁻¹. A partir da superfície de contorno encontrada, foi possível verificar que os valores de DE são maiores em temperaturas e em concentrações mais elevadas, porém em faixas de temperaturas mais baixas (30°C), a concentração de ácido (3 a 5 mol.L⁻¹) não influenciou na DE.

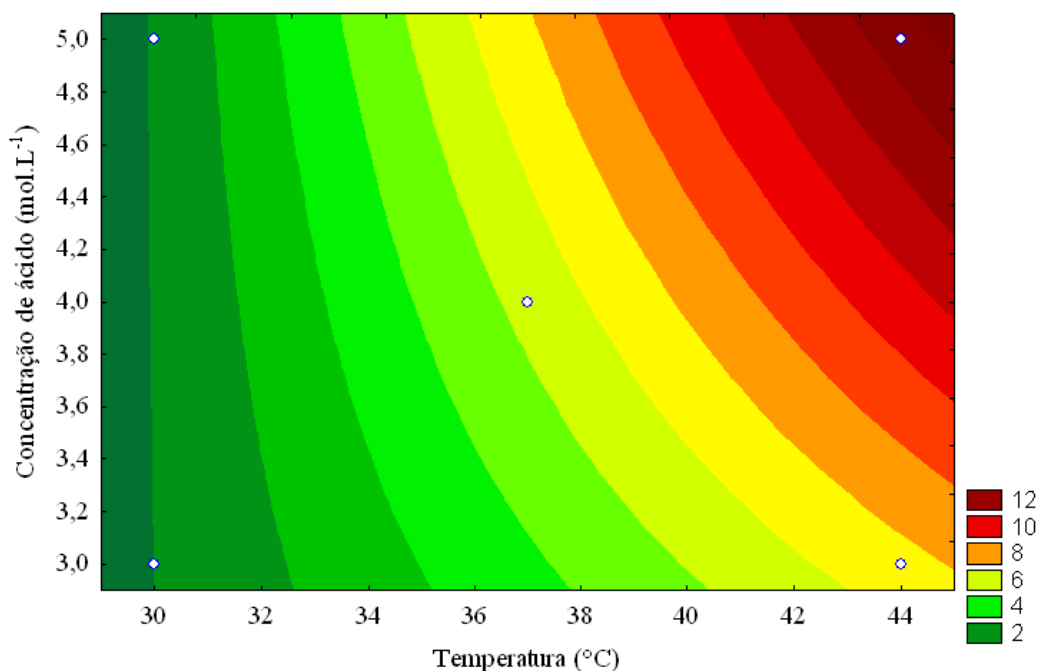


Figura 17. Superfície de contorno da interação entre a temperatura e concentração de ácido clorídrico sobre a DE.

Os resultados encontrados assemelham-se aos trabalhos de Zambrano e Camargo (1999) e Zambrano e Camargo (2001) que estudaram a hidrólise do amido de mandioca. Os valores de dextrose equivalente (DE) foram maiores em temperaturas e concentrações de ácido mais elevadas. Os autores encontraram maiores porcentagens de hidrólise em tempos de reação e concentração de ácido menores, porém utilizando temperaturas mais elevadas (40-54 °C). Thys (2009) ao estudar a hidrólise do amido de pinhão para utilizá-lo como possível substituto de gordura, encontrou valores de DE entre 0 e 6,5 ao empregar as seguintes condições de reação: tempo de 6 horas, temperatura variando entre 30 e 44°C e concentração de ácido variando de 1,2 a 3,2 mol.L⁻¹. Como a temperatura é considerada um parâmetro limitante devido à

gelatinização do amido, somente as condições de tempo e concentração de ácido foram aumentadas visando maiores valores de DE, já que valores mais elevados são requeridos para o processo de microencapsulação.

Diferenças entre a razão e a extensão da hidrólise ácida entre amidos de diferentes fontes e até dentro da mesma espécie, podem ser atribuídas a diferenças no tamanho dos grânulos, extensão das interações de amido das regiões amorfas e cristalinas dos grânulos, extensão de fosforilação, quantia de ligações $\alpha(1-6)$ de cadeias de complexos de amilose-lipídio e extensão da distribuição das ligações $\alpha(1-6)$ entre os domínios amorfo e cristalino. Além disso, provavelmente a hidrólise ácida é influenciada pelo número e tamanho de poros na superfície granular (Jayakody e Hoover, 2002).

Investigações prévias têm mostrado que o ácido penetra profundamente no grânulo, agindo principalmente na região amorfa, ou seja, na região correspondente à presença de amilose (Chattopadhyaya *et al.*, 1998). O ácido primeiro degrada gradualmente a superfície dos grânulos de amido, depois a região interna. Para elucidar a razão lenta da hidrólise da região cristalina do grânulo do amido, duas hipóteses foram propostas: a primeira considera que o empacotamento denso das cadeias e dos cristais de amido não permite prontamente a penetração de H_3O^+ nas regiões; a segunda que a transformação cíclica-linear (requerida para hidrólise de ligação glicosídica) ocorre muito lentamente devido à imobilização da conformação do açúcar dentro dos cristais de amido (Jayakody e Hoover, 2002).

Quanto à ação da temperatura, ela não apenas aumenta a reatividade da hidrólise da ligação glicosídica, mas também facilita a difusão da solução ácida através da matriz de amido (Jayakody e Hoover, 2002). Shariffa *et al.* (2009) reportaram que o aquecimento de uma solução de amido pode causar o inchamento parcial da região amorfa dos grânulos, facilitando a difusão e ação do ácido no grânulo. De acordo com Juszcak *et al.* (2003), os poros presentes na superfície granular podem tornar-se centros de ataque e o aumento da temperatura pode permitir que esses pontos sejam mais facilmente degradados pelo ácido (Shariffa *et al.*, 2009).

Thys (2009), ao caracterizar os grânulos do amido de pinhão, detectou que os mesmos apresentam superfícies lisas e variadas formas nas quais coexistem tanto grânulos ovais, quanto elipsóides truncados ou hemisféricos. Quanto ao conteúdo de amilose, o referido autor determinou que o amido de pinhão possui baixo teor entre 23-

26 %. Como a quantidade de poros e o conteúdo de amilose interferem na hidrólise, possivelmente, a extensão desta reação seja afetada negativamente, devido às características apresentadas.

5.2 Caracterização das microcápsulas

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados referentes à caracterização das microcápsulas, preparadas conforme item 4.4, via análises morfológicas, calorimétricas e analíticas, bem como as isotermas de sorção. Os resultados relativos à caracterização do amido nativo obtido conforme item 4.2, e hidrolisado (DE 6 e DE 12) (item 4.3) serão discutidos juntamente com os resultados encontrados para as microcápsulas.

5.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

A microestrutura do amido nativo e hidrolisado foi avaliada a fim de detectar as mudanças morfológicas produzidas pela hidrólise ácida. As fotomicrografias apresentadas nas Figuras 18, 19 e 20 correspondem ao amido nativo, amido hidrolisado DE 6 e amido hidrolisado DE 12, respectivamente. Observa-se que o amido nativo apresentou superfície lisa, sem poros e formas globosas e elipsoides. Por sua vez, os amidos hidrolisados apresentaram formas irregulares com a presença de fissuras e protuberâncias em sua superfície. Os formatos encontrados para o amido de pinhão foram característicos desta fonte botânica, visto que os resultados deste trabalho corroboram com os de Bello-Pérez *et al.*(2006), Thys (2009) e Capella *et al.*(2009) que analisaram microscopicamente a estrutura do amido de pinhão. Os grânulos da semente de pinhão apresentam estruturas similares ao amido de araruta (*Marantha arundinaceae*) e mandioca (*Manihot esculenta*), que são elipsoides (Capella *et al.*, 2009). Quanto ao tamanho, as fotomicrografias revelaram variações de 10 a 20 μm para ambas as amostras, valores similares aos reportados por Bello-Pérez *et al.*(2006) que foram de 10-25 μm e de Thys (2009) (7-20 μm).

Quanto à hidrólise, foi possível constatar que a mesma não foi uniforme, visto que alguns grânulos foram mais afetados que outros. Além disso, o amido hidrolisado de DE 12 apresentou, claramente, maior rompimento granular do que o amido de DE 6,

evidenciando o resultado esperado pela condições de hidrólise utilizadas nesses tratamentos.

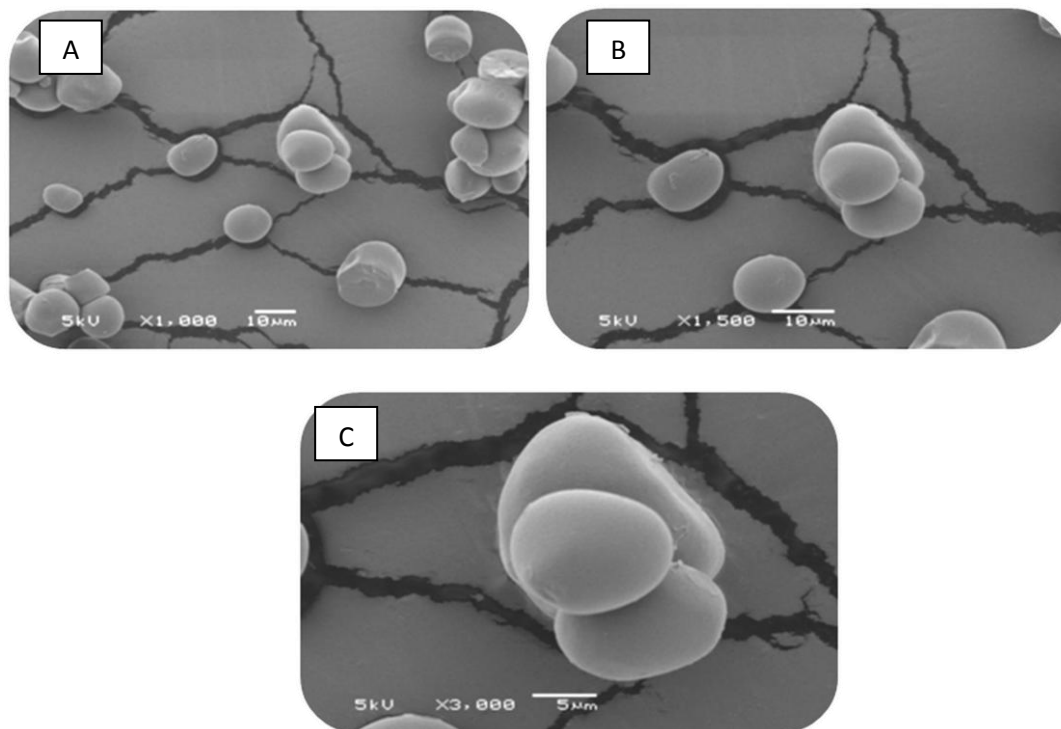


Figura 18. Fotomicrografias obtidas por MEV do amido nativo. 1000 x (A) 1500 x (B) e 3000 x (C).

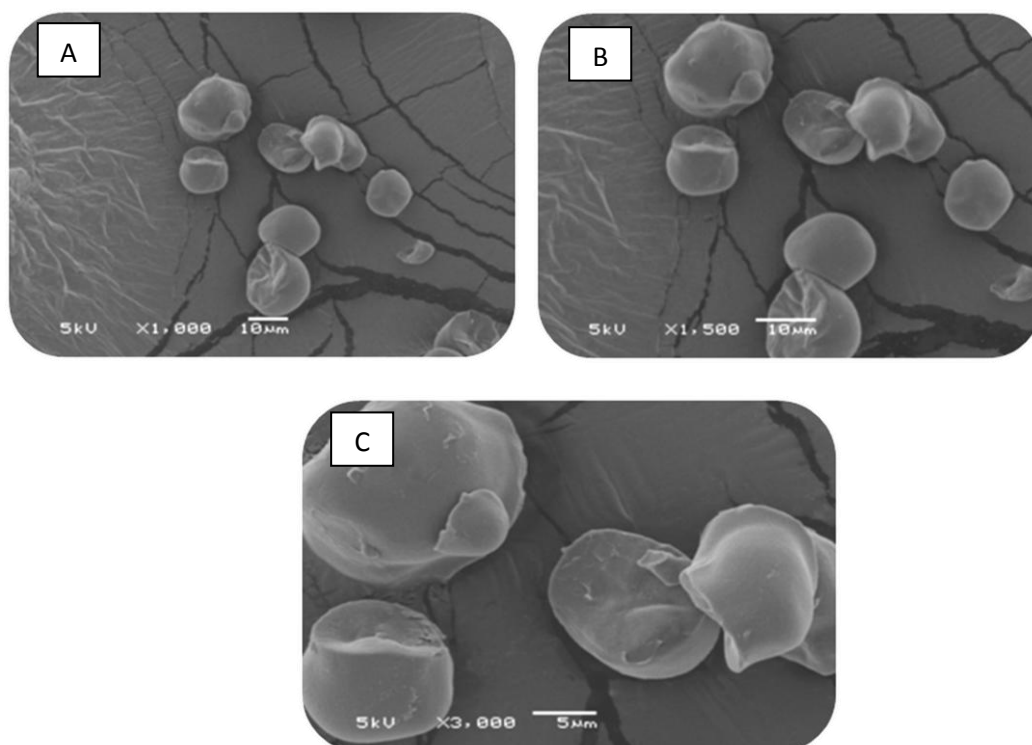


Figura 19. Fotomicrografias obtidas por MEV do amido hidrolisado DE 6. 1000 x (A), 1500 x (B) e 3000 x (C).

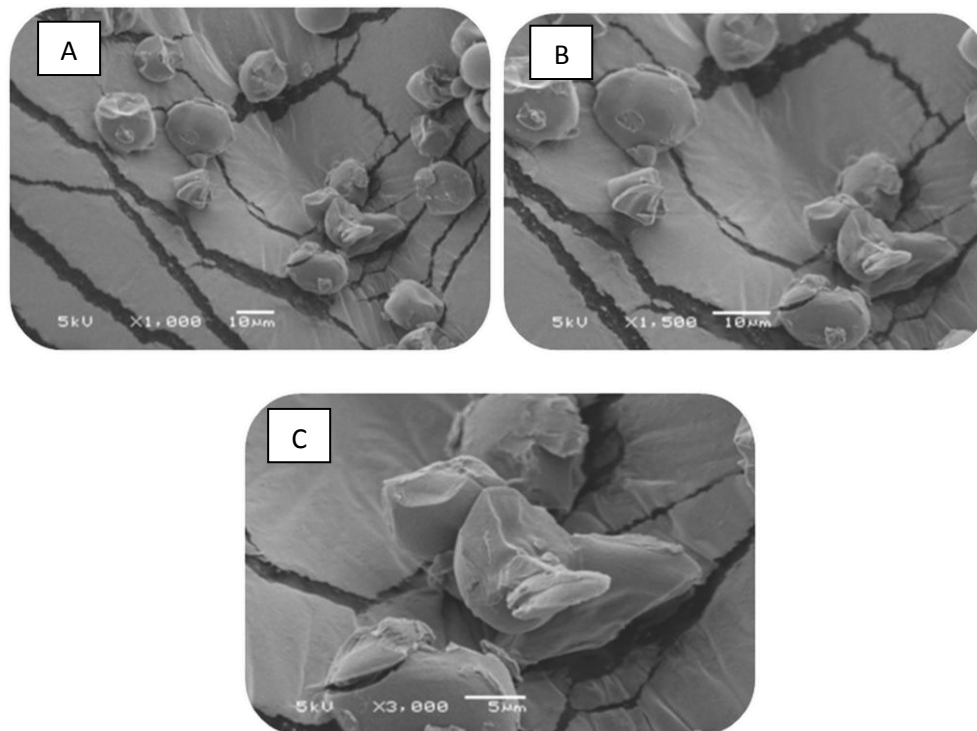


Figura 20. Fotomicrografias obtidas por MEV do amido hidrolisado DE 12. 1000 x (A), 1500 x (B) e 3000 x (C).

A Figura 21 mostra fotomicrografias do material a ser encapsulado, ou seja, o β -caroteno; o tamanho de partícula apresentado pelo mesmo foi inferior a 10 μm , até quando este apresentou aglomeração de partículas.

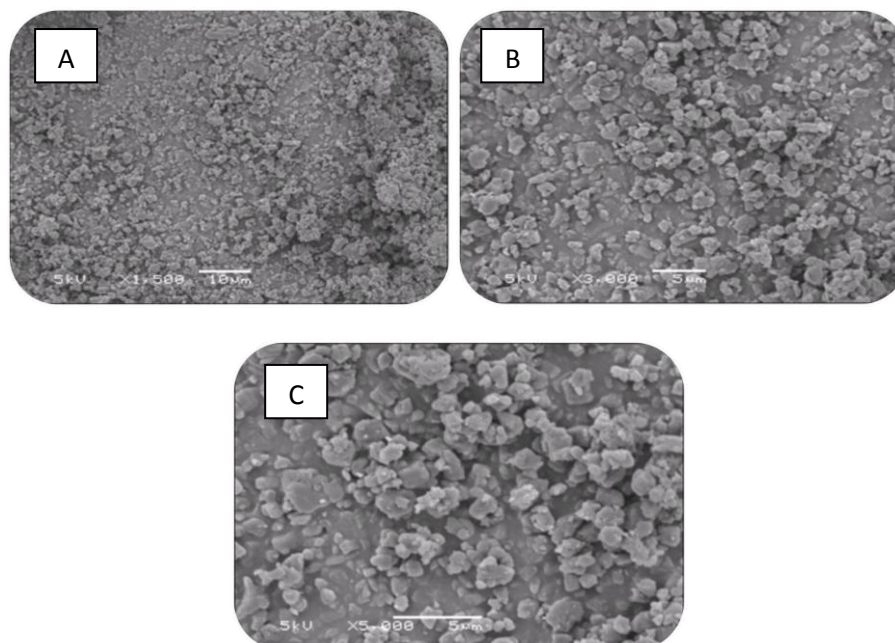


Figura 21. Fotomicrografias obtidas por MEV do β -caroteno em magnitudes de 1500 x (A), 3000 x (B) e 5000 x (C).

A morfologia dos encapsulados foi avaliada primeiramente por microscopia ótica, a qual se mostrou uma importante ferramenta de análise preliminar para verificar a formação das microcápsulas. A Figura 22 apresenta fotomicrografias obtidas pela microscopia ótica de cápsulas formadas com os diferentes materiais de parede testados, através destes resultados foi possível observar a formação de microcápsulas de diferentes formas, porém sem riqueza de detalhes.

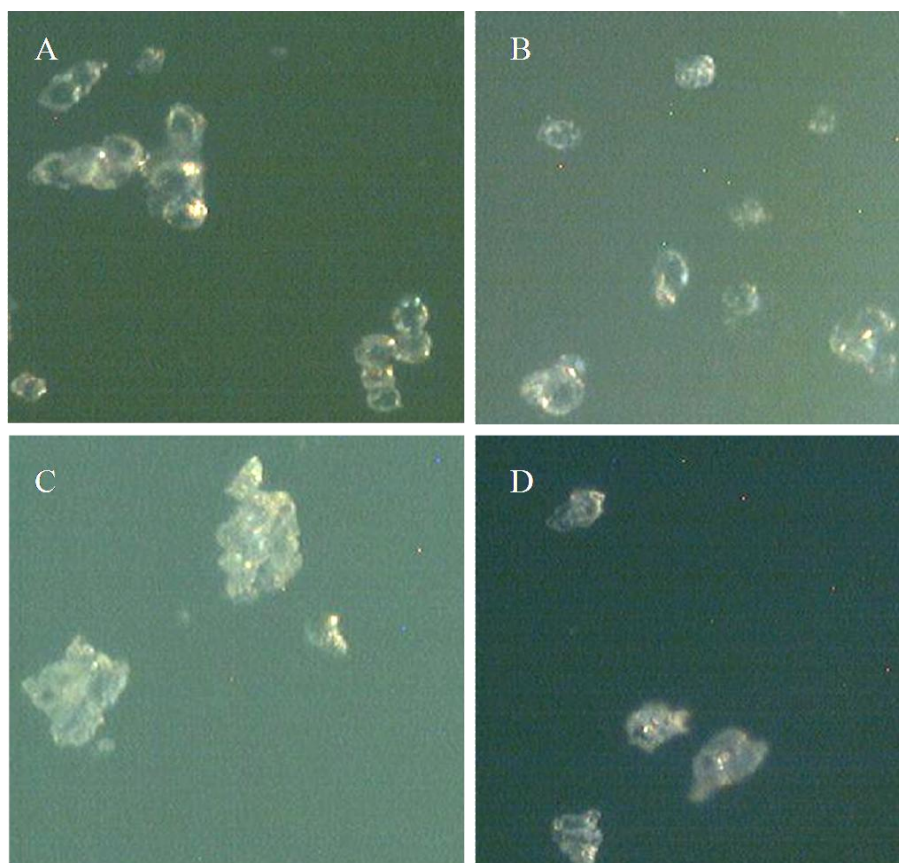


Figura 22. Fotomicrografias obtidas pela microscopia ótica (100 x) das cápsulas obtidas com o amido nativo (A), amido hidrolisado DE12 (B), amido nativo e gelatina (C) e amido hidrolisado DE 12 e gelatina (D).

As fotomicrografias dos encapsulados preparados com amido nativo e hidrolisado obtidas por MEV estão expostas na Figura 23. As cápsulas formadas com estes materiais de parede apresentaram formas geométricas indefinidas e superfícies lisas com algumas protuberâncias. Além disso, foi possível constatar que ocorreu variabilidade de tamanho e formação de alguns agregados. Diferenças consideráveis foram observadas entre as microcápsulas, visto que as compostas de amido nativo apresentaram maior aglomeração de partículas, que pode ser atribuído a maior

viscosidade aparente das suspensões feitas com esse amido não-modificado e a sua baixa capacidade de formar filmes.

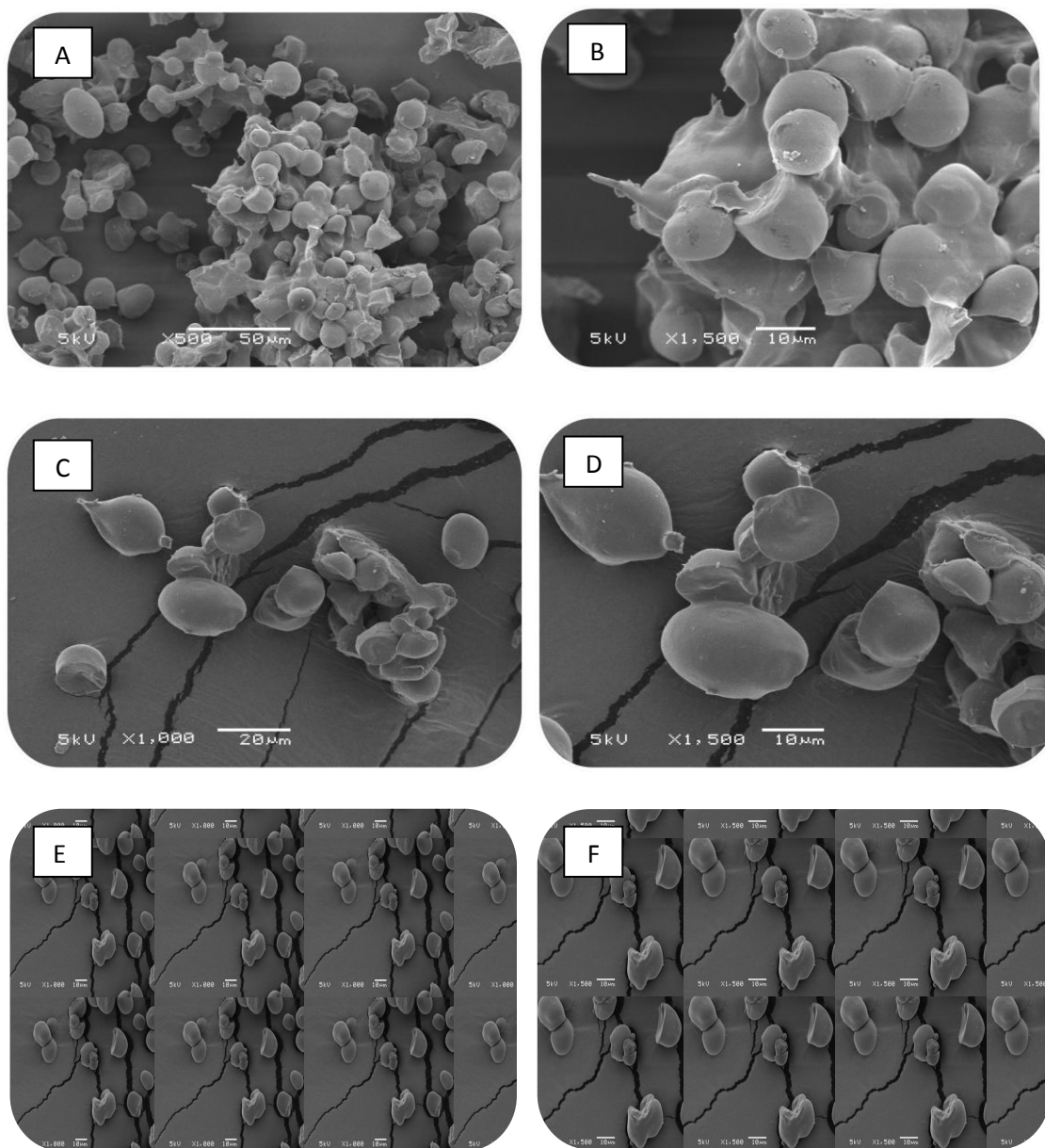


Figura 23. Fotomicrografias obtidas através da MEV das cápsulas preparadas com amido nativo, a 500 x (A) e 1500 x (B) amido hidrolisado (DE 6) a 1000 x (C) e 1500 x (D) e amido hidrolisado (DE 12) a 1000 x (E) e 1500 x (F).

Todas micropartículas produzidas apresentaram estruturas irregulares e semelhantes, que é típico dos pós preparados por liofilização (Man *et al.*, 1999, Kaushik e Roos, 2007; Fang e Bhandari, 2010). Righetto e Neto (2002) ao encapsular suco de acerola verde em matrizes de goma arábica e maltodextrina, observaram diferenças consideráveis entre microcápsulas obtidas por atomização e liofilização, visto que as

cápsulas atomizadas mostraram formas globosas, e as liofilizadas, formas totalmente indefinidas. Man *et al.* (1999) também concluíram que o tipo de processo de secagem influencia na estrutura dos grânulos de pó, encontrando estruturas mais esféricas ao utilizar a atomização e irregulares com a liofilização. Essas diferenças na estrutura dos pós podem estar relacionadas às condições de operação do processo, visto que a liofilização utiliza alto vácuo e baixas temperaturas, de modo que pressiona as partículas dos produtos produzindo assim partículas com menor teor de umidade e maior tamanho (Man *et al.*, 1999).

A MEV dos encapsulados preparados com amido e gelatina pode ser visualizada na Figura 24. Ocorreram semelhanças entre as cápsulas produzidas com gelatina e os pós anteriormente apresentados, como formas indefinidas e tamanhos variados, porém diferenças consideráveis foram observadas como a formação de superfícies mais irregulares. Bruschi *et al.* (2003) também observaram a formação de cápsulas com formatos mais irregulares ao utilizar gelatina para encapsular própolis através da atomização como técnica encapsulante. As cápsulas tornaram-se mais esféricas utilizando manitol, visto que açúcares de baixa massa molar atuam como plasticificantes.

A avaliação da microestrutura apresentada por produtos encapsulados é importante por relacionar-se com a capacidade de proteção apresentada por diferentes polímeros. Rosenberg *et al.* (1990), sugerem que indicações desta capacidade são fornecidas pelo grau de integridade e pela porosidade das microcápsulas. Materiais com propriedades encapsulantes pobres originam microcápsulas com superfícies muito porosas, altamente rugosas e com quebras. A microencapsulação de materiais voláteis ou ingredientes sensíveis utilizando um encapsulante com estas características resultará em um produto instável. Contudo, pode-se dizer que as cápsulas contendo gelatina apresentaram estruturas propensas a proporcionar maior instabilidade ao núcleo do que as amostras preparadas somente com amido, visto que as mesmas mostraram estruturas mais indefinidas e maiores imperfeições superficiais.

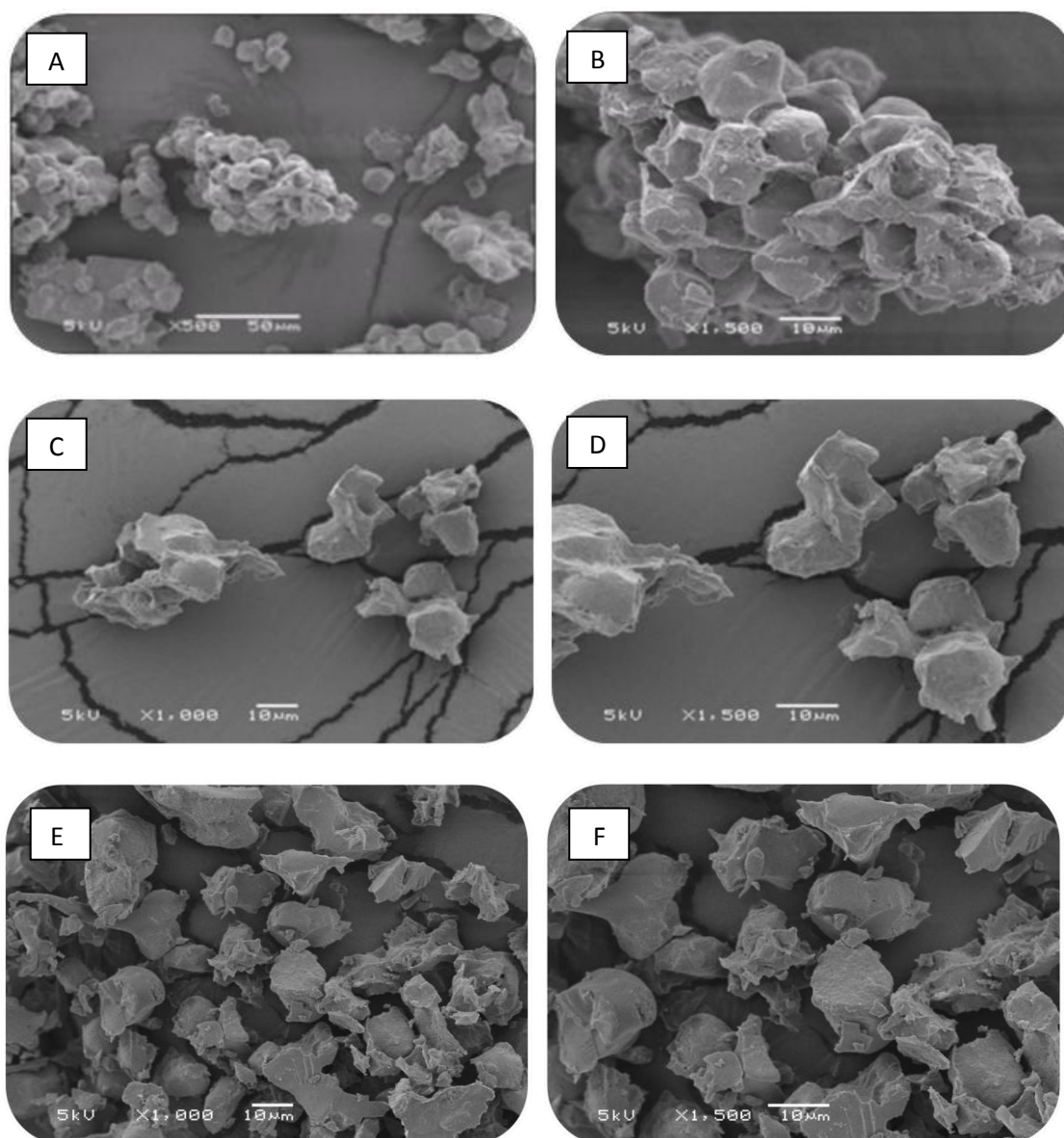


Figura 24. Fotomicrografias obtidas através da MEV das cápsulas preparadas com amido nativo, a 500 x (A) e 1500 x (B); amido hidrolisado (DE 6) a 1000 x (C) e 1500 x (D) e amido hidrolisado (DE 12) a 1000 x (E) e 1500 x (F) com gelatina.

5.2.2 Conteúdo total e superficial de β -caroteno

Os resultados referentes ao conteúdo total e superficial das microcápsulas estão apresentados na Tabela 13. Diferenças significativas foram detectadas entre as amostras quanto a esses dados. As cápsulas preparadas com amido hidrolisado DE 12 (amostra C) apresentaram maior conteúdo total de carotenóide (93,41%) do que o amido nativo

(64,95 ± 2,14 %). As amostras com gelatina não apresentaram diferenças significativas quanto ao conteúdo total.

As cápsulas preparadas com amido modificado DE 12 apresentaram menor conteúdo superficial de carotenóide (12,72±0,65 %) enquanto o amido nativo mostrou maior conteúdo superficial (43,11±1,06 %). Esses resultados indicam que, dos materiais estudados, o amido hidrolisado DE 12 apresenta melhores propriedades de retenção, e comprovam que a modificação altera propriedades relacionadas à formação de filmes. Provavelmente, esses resultados estão relacionados à composição do amido modificado depois do aquecimento, visto que a amilose livre solúvel pode se associar para formar uma rede contínua ligada por pontes de hidrogênio, resultando em uma estrutura gel que envolve o β-caroteno (Loksuwan, 2007). Além disso, a presença de maiores níveis de amilose solúvel livre pode provocar, mais rapidamente, a formação de um envoltório ao redor do β-caroteno prevenindo a perda desse composto durante a secagem (Loksuwan, 2007). Cabe ressaltar que o conteúdo superficial ou impregnado na parede corresponde aos compostos não encapsulados, logo eles degradam com maior facilidade, pois estão expostos às condições ambientais e podem sofrer reações deteriorantes como a oxidação.

Tabela 13. Conteúdo total e superficial de carotenóide apresentado pelas microcápsulas preparadas a partir de amido nativo sem (A) e com gelatina (AG), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG).

Amostras	Conteúdo total (%)	Conteúdo superficial (%)
A	64,95 ± 2,14 ^a	43,11 ± 1,06 ^a
AG	61,35 ± 1,54 ^a	30,28 ± 0,62 ^b
B	83,50 ± 1,49 ^b	24,16 ± 0,65 ^c
BG	79,25 ± 0,85 ^b	14,79 ± 0,80 ^d
C	93,41 ± 1,47 ^c	18,64 ± 0,50 ^e
CG	90,76 ± 0,88 ^c	12,72 ± 0,65 ^f

*Média de três repetições ± desvio padrão. Letras distintas na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

A presença da gelatina nas amostras não proporcionou diferenças significativas no conteúdo total das mesmas, porém as cápsulas apresentaram menor conteúdo superficial. Em um estudo feito por Yoshii *et al.* (2001), foi constatado que a adição de gelatina à uma solução encapsulante, à base de maltodextrina e goma arábica, promoveu um aumento da retenção de etilbutirato durante a atomização, além de melhorar o

controle das taxas de liberação desse composto volátil. Os autores sugeriram, como explicação, a formação de uma crosta na superfície das partículas.

Leme *et al.*(1973) relatam que perdas mínimas de vitaminas ocorreram durante o processo de liofilização de suco de acerola: 5% para o ácido ascórbico e 0% para o β -caroteno. Desobry *et al.*(1998) constataram perdas de 11 % no processamento por atomização e 8 % por liofilização ao encapsular β -caroteno com maltodextrina. Deve-se ressaltar, no entanto, que no trabalho conduzido por Leme *et al.* (1973) , a quebra do vácuo no liofilizador se deu com nitrogênio, enquanto nos demais trabalhos a quebra se deu com ar. A interação do produto no ponto final de secagem com oxigênio pode ser um fator importante nas perdas iniciais ocorridas, uma vez que o material ativo superficial poderia ser rapidamente degradado.

5.2.3 Conteúdo de umidade

A umidade em base seca encontrada para todas as microcápsulas permaneceu em torno de uma média correspondente a $6,23 \pm 2,09$ %, ou seja, foram obtidas amostras com baixo teor de umidade, sem *caking* ou aglomeração. O desvio encontrado pode ser explicado pela diferença na eficiência do equipamento devido a fatores como qualidade do óleo da bomba, temperatura externa e quantidade de amostras colocada no equipamento. Além disso, diferenças nos valores de umidade do material de parede (10-15 %) podem causar esse desvio de umidade das microcápsulas liofilizadas. Sutter *et al.* (2007) também utilizaram a liofilização para encapsular β -caroteno em matrizes de manitol e encontraram valores muito baixos de umidade entre 0,15 a 1,73 % devido a maior eficiência do equipamento utilizado, visto que o mesmo trabalhou em condições mais extremas de operação como temperatura do condensador (-60°C) e pressão da câmara (4×10^{-4} mbar). O conteúdo de umidade encontrado neste trabalho foi similar aos reportado por outros autores que utilizaram a atomização (Cai e Corke, 2000; Loksuwan, 2007; Ersus e Yurdagel, 2007), porém cabe ressaltar que essa técnica emprega altos valores de temperatura de secagem, ao contrário da liofilização. Cai e Corke (2000) encontraram valores de umidade entre 1,95 a 6,98 % ao empregar temperaturas do ar de secagem entre 150 e 210°C para encapsular betacianina com maltodextrinas. Valores de umidade entre 2 a 6 % foram obtidos por Loksuwan ao encapsular β -caroteno em amido de tapioca. Já Ersus e Yurdagel (2007) obtiveram uma

faixa mais estreita de umidade entre 2,74 e 3,42% ao encapsular antocianinas em matrizes de maltodextrina, empregando temperaturas de secagem de 160 a 200°C.

5.2.4 Distribuição granulométrica

A análise da distribuição do tamanho das microcápsulas liofilizadas e do amido nativo (item 4.2) e hidrolisado DE 12 está apresentada na Tabela 14. O diâmetro médio volumétrico ($D_{4,3}$) para o amido nativo foi $15,01 \pm 0,03 \mu\text{m}$ e para o amido modificado DE 12 foi $18,37 \pm 0,23 \mu\text{m}$, esses valores corroboraram com os resultados encontrados na MEV que revelaram tamanhos variando de 10-20 μm para ambas as amostras. As cápsulas preparadas com amido hidrolisado DE 12 apresentaram um diâmetro médio inferior ($21,31 \pm 0,20 \mu\text{m}$) ao apresentado pelas cápsulas preparadas com amido nativo ($24,70 \pm 1,69 \mu\text{m}$). As formulações contendo gelatina apresentaram diâmetro médio superior quando comparadas às formulações feitas somente com amido.

Conforme observado na Tabela 14, em todas as amostras, o diâmetro de partícula correspondente a 10% da distribuição acumulada não foi superior a $7,68 \pm 0,03 \mu\text{m}$, já o diâmetro de partícula correspondente a 90% da distribuição acumulada não excedeu diâmetros de $55,84 \pm 2,54 \mu\text{m}$. Além disso, pode-se observar que as formulações preparadas com amido nativo tendem a apresentar maior dispersão granulométrica do que aquelas preparadas com os amidos hidrolisados.

Os histogramas, expostos no apêndice E, mostraram que todas as amostras, com exceção do amido nativo, apresentaram tamanhos de partículas de 100 μm , logo se pode dizer que o valor acumulado para diâmetros maiores ficou em torno de 10 %. Além disso, através desses histogramas foi possível verificar que as amostras apresentaram uma distribuição de tamanho normal, porém algumas amostras apresentaram distribuição unimodal e outras bimodal. Uma ampla faixa de tamanho de partícula, entre 1 a 100 μm , foi verificada para todas as amostras, este fato pode ser atribuído à trituração das amostras após a liofilização. Pequenas faixas de tamanhos de partículas são desejadas, visto que esta característica está associada à baixa tendência à aglomeração, e consequentemente maior estabilidade (Desai *et al.*, 2005).

Avgoustakis *et al.* (2002) relatou que diferentes métodos de encapsulação também apresentaram estas características; Dib Taxi (2001), Bertolini (2001) e Cardoso

(2000), também encontraram resultados semelhantes para produtos encapsulados por atomização.

Tabela 14. Resultado da análise granulométrica das amostras de amido de pinhão nativo e hidrolisado DE 12 e das microcápsulas preparadas a partir de amido nativo sem (A) e com gelatina (AG), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG).

Amostra	D _{4,3} (µm)	D _{0,1} (µm)	D _{0,5} (µm)	D _{0,9} (µm)	SPAN
Amido nativo	15,01±0,03 ^g	2,10±0,03	15,86±0,02	23,02±0,07	1,32
Amido DE 12	18,37±0,23 ^f	2,46±0,19	17,90±0,23	31,53±0,45	1,62
A	24,70±1,69 ^{cd}	5,37±0,89	21,38±0,89	46,85±4,67	1,94
AG	30,04±0,96 ^a	7,68±0,03	26,67±0,48	55,84±2,54	1,80
B	22,73±0,19 ^d	5,74±0,10	21,90±0,12	38,35±0,50	1,49
BG	26,78±0,17 ^{bc}	7,40±0,11	25,38±0,11	46,19±0,37	1,53
C	21,31±0,20 ^e	5,28±0,06	19,81±0,09	36,95±0,70	1,60
CG	26,91±0,82 ^b	7,45±0,14	25,49±0,46	46,53±1,98	1,53

*Média de três repetições ± desvio padrão. D(4,3 µm): diâmetro médio em volume; D(0,1 µm): diâmetro de partícula correspondente a 10% da distribuição acumulada; D(0,5 µm): diâmetro de partícula correspondente a 50% da distribuição acumulada; D(0,9 µm): diâmetro de partícula correspondente a 90% da distribuição acumulada; SPAN: dispersão granulométrica.

A análise estatística de diferenças de médias (Teste de Tukey, 5% de significância) mostrou que as cápsulas feitas com amido nativo e gelatina apresentaram diâmetro médio significativamente maior quando comparadas às outras amostras. As cápsulas preparadas com amido hidrolisado DE 6 e DE 12 não diferiram de forma significativa quanto ao diâmetro médio de partícula, nem mesmo com a adição de gelatina. O aumento significativo do tamanho de partícula das amostras que contêm gelatina indica que houve recobrimento e/ou aglomeração destas partículas.

A distribuição do tamanho de partículas encontrada empregando a liofilização como técnica de encapsulação está dentro da faixa de tamanho de partículas produzidas por outras técnicas como a atomização e a coacervação, que é de 5 a 150 µm. (Onwulata *et al.* 1994; Desai e Park, 2005; Madene *et al.*, 2006; Favaro-Trindade *et al.*, 2008). Apesar das cápsulas apresentarem tamanho médio de partícula significativamente diferente, elas apresentam uma faixa de tamanho de partículas semelhante, tornando difícil diferenciá-las quanto a este parâmetro.

A distribuição do tamanho das microcápsulas é um fator importante para avaliar o comportamento físico-químico dos encapsulados, embora existam controvérsias na literatura quanto à relação entre a retenção de voláteis e o tamanho de partícula (Chumpitaz, 1995). Chang *et al.* (1988), explicaram que o aumento do tamanho das

partículas resulta numa redução da área superficial em relação ao volume da cápsula, conferindo uma melhora na retenção e na estabilidade, porém pode ocorrer um maior grau de imperfeições na superfície da partícula como poros e fissuras, o que leva a uma redução da proteção quanto à oxidação. Bertolini *et al.* (2001) associaram um maior teor de retenção do recheio para maiores tamanhos de partículas, assim como Desobry *et al.* (1998) que também observaram maior estabilidade, durante a estocagem, de β -caroteno encapsulado em maltodextrina por secagem em tambor, em comparação com o processo por atomização e liofilização, devido a menor relação área/volume das partículas obtidas pela secagem em tambor.

5.2.5 Solubilidade

A solubilidade em água fria e quente dos encapsulados está apresentada na Tabela 15. Através da análise estatística foi constatado que todas as amostras apresentaram diferenças significativas em um nível de confiança de 95% quanto à solubilidade em água fria. Com o aumento do grau de hidrólise (DE), houve um aumento significativo da solubilidade das amostras. Estes resultados encontrados podem ser atribuídos às diferenças na estrutura e composição dos amidos. O amido ácido modificado possui uma maior quantidade de compostos de menor massa molar resultantes da depolimerização do amido nativo durante a hidrólise ácida, aumentando desta forma, a solubilidade do pó (Loksuwan, 2007).

Chang, Lin e Pan (2010) também estudaram a solubilidade de amidos tratados com ácido, e constataram que a solubilidade foi maior do que o seu amido nativo. Além disso, a solubilidade do amido tratado foi maior com o aumento da concentração de ácido. Cabe ressaltar que a solubilidade do amido varia de acordo com a fonte botânica, visto que a interação das moléculas de amido com a água é influenciada pela proporção amilose:amilopectina e pelas características dessas moléculas (distribuição e peso molecular, grau e comprimento de ramificações e conformação) (Singh e Singh 2003).

Tabela 15. Solubilidade em água fria (20°C) e quente (80°C) apresentada pelas microcápsulas liofilizadas preparadas a partir de amido nativo sem (A) e com gelatina (AG), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG).

Amostras	Solubilidade em água fria (%)	Solubilidade em água quente (%)
A	4,28 ± 0,24 ^a	10,15 ± 0,35 ^a
AG	2,63 ± 0,10 ^b	13,75 ± 0,49 ^a
B	14,67 ± 0,85 ^c	56,05 ± 0,92 ^b
BG	10,73 ± 0,45 ^d	62,45 ± 0,35 ^c
C	24,10 ± 0,07 ^e	81,00 ± 1,20 ^d
CG	22,13 ± 0,68 ^f	84,65 ± 1,63 ^d

*Média de três repetições ± desvio padrão. Letras distintas na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). %, massa final de pó/massa inicial de pó.

As amostras preparadas com amido/gelatina apresentaram uma redução da solubilidade das partículas em água fria quando comparadas às cápsulas contendo somente amido como material de parede. Tal comportamento pode ter ocorrido devido à possível formação de um revestimento que dificultou a lixiviação dos compostos de baixa massa molar e a maior hidrofobicidade que a gelatina apresenta quando comparada ao amido, devido ao seu caráter anfipático. Quando comparado a outros materiais de parede, como a goma arábica, os agentes encapsulantes estudados não apresentaram vantagens quanto à solubilidade. Santos *et al.* (2005) estudaram a solubilidade de cápsulas de oleoresina de páprica feitas com goma arábica e as mesmas se dissolveram completamente após 5 minutos sob agitação mecânica em óleo, água e etanol, confirmando a boa solubilidade desse material.

As cápsulas tiveram sua solubilidade aumentada em água quente, visto que pode ter ocorrido a ruptura de algumas microcápsulas seguida de uma maior lixiviação dos compostos de baixa massa molar. De acordo com Fennema (2000) e Ordóñez (2005), sob altas temperaturas, ocorre uma maior vibração das moléculas de amido que causam o rompimento das ligações intermoleculares e conseqüentemente permitem ligações de pontes de hidrogênio com as moléculas de água através dos sítios de ligação liberados. Ao contrário dos resultados encontrados para a solubilidade em água fria, as amostras com gelatina apresentaram maior solubilidade em água quente, visto que a 80°C, a gelatina é capaz de se dissolver e, conseqüentemente se solubilizar no meio.

5.2.6 Propriedades térmicas e termodinâmicas

A Tabela 16 apresenta as propriedades térmicas e termodinâmicas dos amidos nativo e hidrolisado DE 12 e das cápsulas preparadas com amido nativo, amido hidrolisado DE 12, e da mistura do amido nativo e gelatina.

Tabela 16. Propriedades térmicas e termodinâmicas do amido nativo, amido hidrolisado DE 12 e das microcápsulas preparadas a partir de amido nativo sem (A) e com gelatina (AG) e amido hidrolisado DE 12.

Amostra	T _o (°C)	T _g (°C)	T _f (°C)	ΔH _g (J.g ⁻¹)
Amido Nativo	52,48 ± 0,82 ^d	65,34 ± 0,52 ^c	80,44 ± 0,98 ^d	8,89 ± 0,14 ^c
Amido DE 12	50,11 ± 0,93 ^d	69,64 ± 0,61 ^b	95,56 ± 1,06 ^a	8,50 ± 0,14 ^c
A	56,74 ± 0,59 ^c	66,85 ± 0,80 ^c	75,23 ± 0,90 ^e	3,64 ± 0,07 ^d
AG	90,49 ± 1,11 ^a	90,56 ± 0,88 ^a	93,59 ± 1,21 ^a	16,45 ± 0,26 ^a
C	67,61 ± 0,98 ^b	71,79 ± 0,62 ^b	85,30 ± 0,82 ^b	9,25 ± 0,58 ^b

*Média de duas repetições ± desvio padrão. Letras distintas na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$); T_g, temperatura de gelatinização; T_o, temperatura inicial da gelatinização; T_f, temperatura final da gelatinização; ΔH_g, entalpia de gelatinização.

O valor da T_g para o amido de pinhão se aproximou muito ao valor reportado por Bello-Pérez *et al.* (2006) de 63,4°C ± 0,4; já Thys (2009) encontrou um valor de 47,64 °C para a T_g do amido de pinhão. Diferenças de valores de T_g dentro da mesma espécie botânica podem ocorrer devido às condições do meio que afetam diretamente as características da planta como composição e distribuição de tamanhos de grânulos (Ellis *et al.*, 1998). Os grânulos menores apresentam maiores temperaturas de gelatinização (inicial, de pico e final) que os grânulos grandes (Yonemoto, 2006).

A T_g encontrada para o amido modificado foi mais elevada, visto que a temperatura de gelatinização é atribuída à hidrólise da lamela amorfa (amilose), que desestabiliza a lamela cristalina (amilopectina) aumentando a hidratação e o inchamento dos cristais. Quando a modificação é feita, conseqüentemente, a lamela amorfa é degradada, e as temperaturas relacionadas à gelatinização são deslocadas para temperatura mais altas (Garcia *et al.*, 1999). Os resultados obtidos são semelhantes aos reportados por Lawal *et al.* (2005). Segundo estes autores, sem destruir sua estrutura granular, a modificação ácida aumenta a temperatura e a endoterma de gelatinização dos amidos. Por outro lado, os resultados de T_g encontrados por Cai e Corke (2000), discordam dos resultados encontrados. Esses autores encapsularam betacianina extraída do amarantus e verificaram a temperatura de transição vítrea para as diferentes amostras

preparadas com amido de milho nativo e modificado, encontrando valores de $60,5 \pm 0,4$ para o amido nativo e de $58,0 \pm 0,8$ para o hidrolisado .

Cabe ressaltar que foram feitos testes para encontrar a T_g das cápsulas preparadas com amido hidrolisado DE 12 e gelatina, porém não foi possível identificá-la pelo método utilizado, para detectá-la seria preciso aumentar a faixa de temperatura testada.

A T_o encontrada para o amido hidrolisado DE 12 foi menor do que a encontrada para o amido nativo, assim como uma ampla distribuição na transição endotérmica, este fato pode indicar heterogeneidade cristalina, onde cristais menos estáveis fundiram em temperaturas mais baixas e os cristais restantes fundiram a temperaturas mais altas. Isto indica que há uma dependência entre o comprimento das cadeias e as temperaturas de transição e entalpia de fusão (Elfstrand *et al.*, 2004; Yonemoto, 2006).

Diferenças significativas não foram encontradas entre a T_g do amido nativo e cápsulas preparadas com este amido, o mesmo foi observado para o amido hidrolisado. A entalpia de gelatinização do amido nativo foi próxima a encontrada por Bello-Pérez *et al.* (2006) referente a $8,1 \pm 0,5 \text{ J.g}^{-1}$. Comparando amido nativo com o hidrolisado, observa-se que a entalpia de gelatinização (ΔH_g) foi reduzida após modificação, provavelmente devido à cisão de ligações glicosídicas durante o processo de hidrólise química, o que condiz com os resultados de Lawal *et al.* (2005).

As cápsulas preparadas com amido nativo sofreram um decréscimo na ΔH_g , diferente das cápsulas preparadas com amido hidrolisado que sofreram um aumento na ΔH_g . Essas diferenças podem ser explicadas devido ao aquecimento sofrido anteriormente, durante o preparo da suspensão a ser liofilizada. Quando uma suspensão aquosa de amido é aquecida acima de certa temperatura, ligações intermoleculares são rompidas e pontes de hidrogênio com a água são estabelecidas, juntamente com o inchamento granular e com o decréscimo do número e tamanho das regiões cristalinas. Conforme Elfstrand *et al.* (2004) e Yonemoto (2006) cadeias mais longas de moléculas de amilopectina fornecem altos valores de entalpia de fusão (Elfstrand *et al.*, 2004; Yonemoto, 2006). Diferente do amido nativo, o amido modificado, possui estruturas fragmentadas, principalmente as cadeias de amilose, que não conseguem reter água em seu interior (Hoover, 2001; Ordonez *et al.*, 2005).

As cápsulas compostas por amido nativo e gelatina, apresentaram um aumento considerável na T_g , assim como na ΔH_g . Kasapis e Sablani (2005) encontraram valores de T_g para gelatina (100% de sólidos) de 95 a 200°C, ou seja, valores bem mais elevados do que os reportados para o amido de pinhão, o que pode explicar o aumento de T_g e de ΔH_g para as amostras com gelatina.

Os termogramas do amido nativo, amido hidrolisado DE 12 e das cápsulas preparadas com amido nativo, amido nativo e gelatina e amido hidrolisado DE 12 podem ser visualizados nas Figuras 25 a 29, respectivamente.

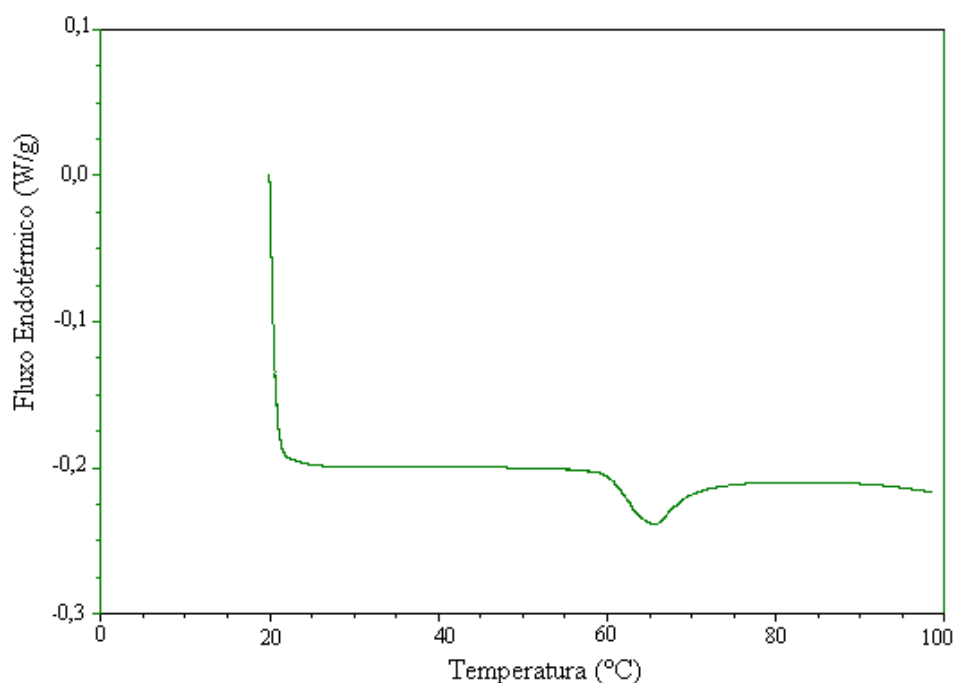


Figura 25. Termograma do amido de pinhão nativo.

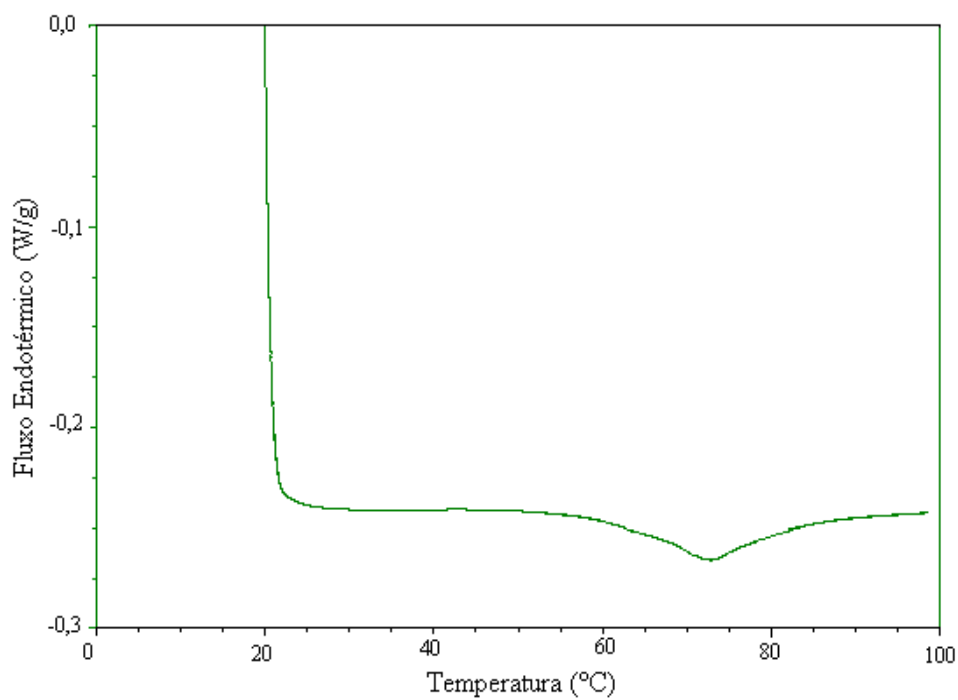


Figura 26. Termograma do amido de pinhão hidrolisado DE 12.

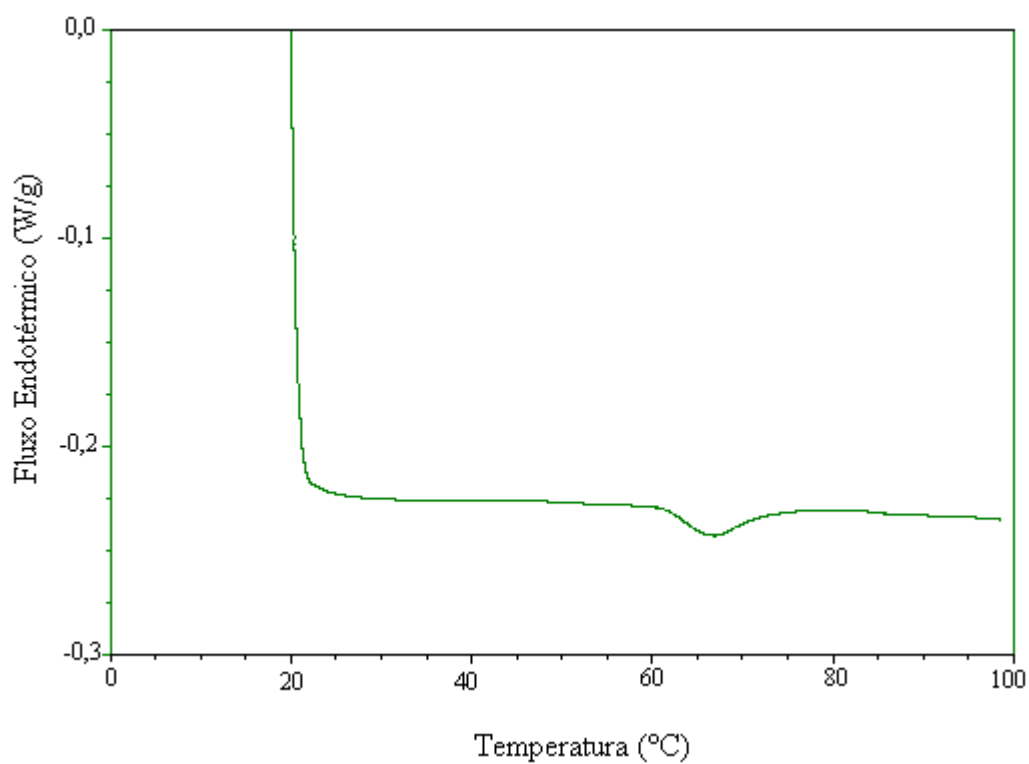


Figura 27. Termograma da cápsula liofilizada preparada com amido de pinhão nativo.

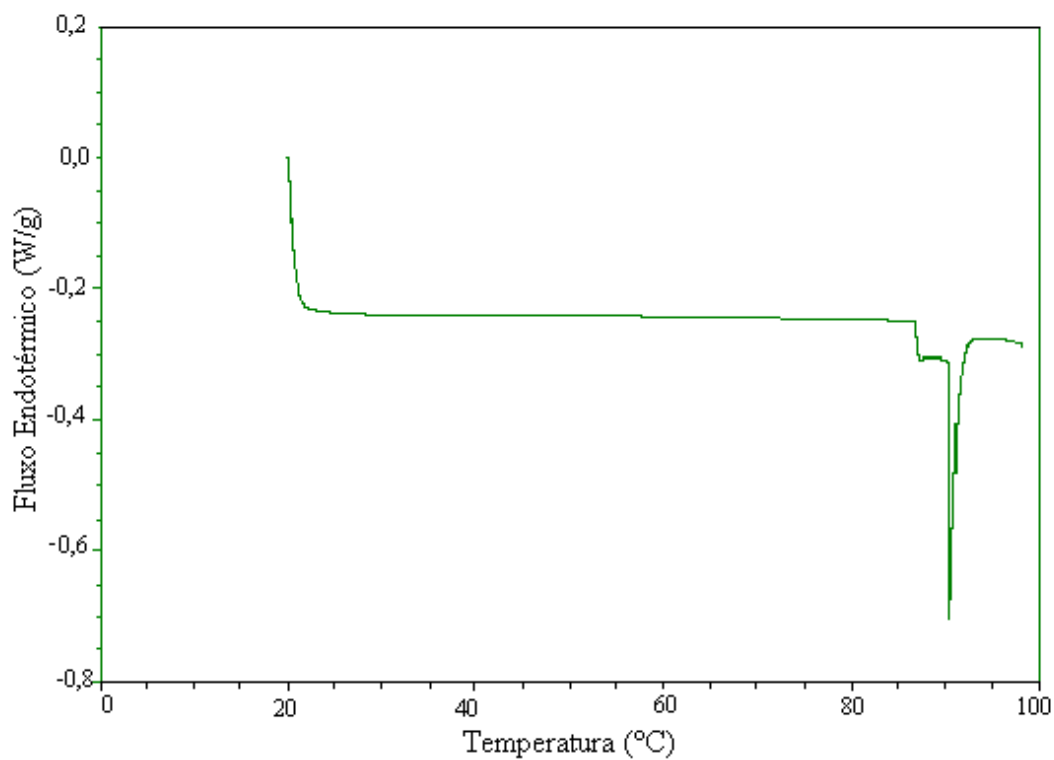


Figura 28. Termograma da cápsula liofilizada preparada com amido de pinhão nativo e gelatina.

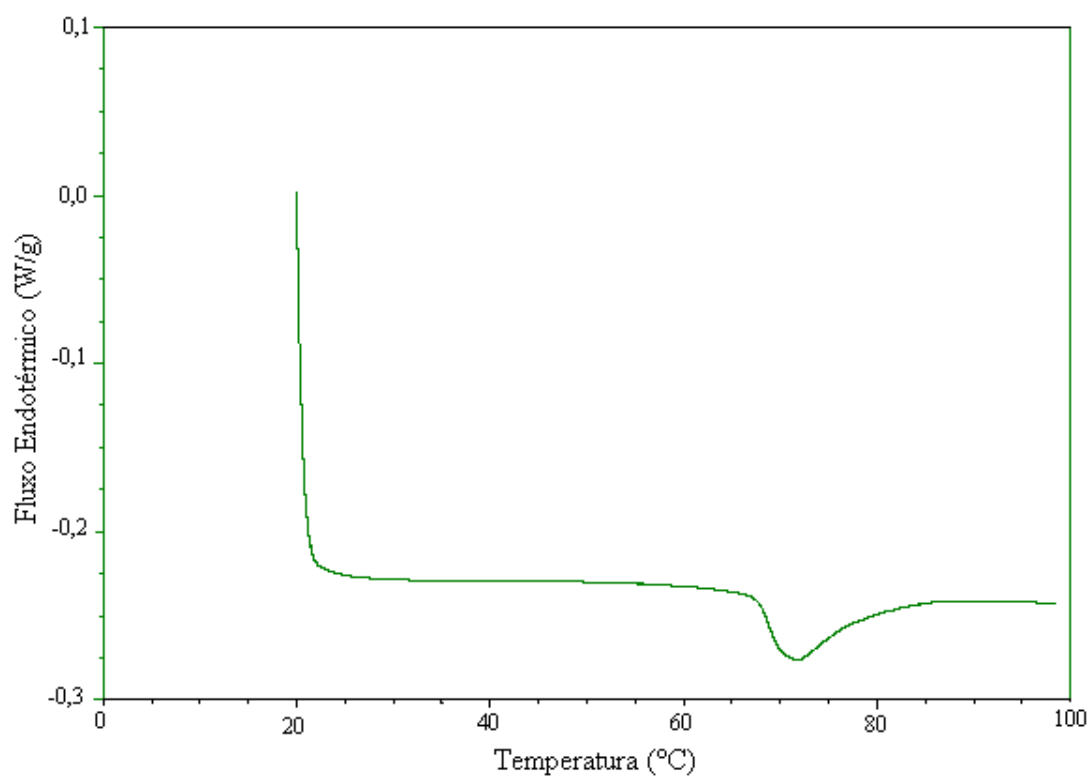


Figura 29. Termograma da cápsula liofilizada preparada com amido de pinhão hidrolisado DE 12.

5.2.7 Isotermas de sorção de água

As isotermas de sorção relacionam a quantidade de água de um alimento com a atividade de água (ou umidade relativa da atmosfera que circunda o alimento), uma vez alcançado o equilíbrio à temperatura constante. Os valores de umidade de equilíbrio encontrados para as cápsulas preparadas com amido hidrolisado com DE 12 nas diferentes temperaturas e a_w estudadas encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17. Valores de atividade água (a_w) e umidade de equilíbrio em base seca (X_{eq}) encontrados para as cápsulas preparadas com amido hidrolisado DE 12, em diferentes temperaturas (10,20 e 30°C).

10°C		20°C		30°C	
a_w	X_{eq} (%)	a_w	X_{eq} (%)	a_w	X_{eq} (%)
0,113	7,05 ± 0,11	0,112	5,59 ± 0,11	0,112	4,77 ± 0,05
0,235	11,19 ± 0,35	0,23	8,65 ± 0,12	0,22	7,15 ± 0,10
0,335	12,82 ± 0,04	0,332	12,79 ± 0,10	0,325	11,77 ± 1,48
0,440	13,60 ± 0,05	0,43	12,38 ± 0,07	0,43	10,84 ± 0,15
0,675	18,40 ± 0,15	0,655	16,59 ± 0,11	0,635	14,38 ± 0,14
0,760	20,98 ± 0,11	0,755	17,66 ± 0,10	0,755	17,17 ± 0,02
0,870	24,56 ± 0,36	0,853	21,03 ± 0,03	0,835	19,27 ± 0,10
0,914	28,65 ± 0,41	0,907	25,34 ± 0,48	0,9	23,37 ± 0,51
0,978	38,32 ± 0,15	0,973	36,64 ± 1,21	0,968	34,53 ± 1,81

Os parâmetros das equações testadas, assim como o coeficiente de determinação (R^2) e o erro relativo médio (ERM) correspondentes, estão apresentados na Tabela 18. Os resultados obtidos para as isotermas de sorção dos encapsulados preparados com amido hidrolisado DE 12 ajustaram-se bem aos diferentes modelos testados nas três temperaturas estudadas, porém o modelo de Peleg foi considerado o mais adequado, seguido dos modelos de Oswin e Chung-Pfost, visto que os coeficientes de correlação foram mais próximos de 1 e os valores médios do ERM foram menores (inferiores a 10 %).

Os resultados encontrados foram similares aos reportados por Thys *et al.* (2010) para o amido de pinhão nativo, visto que a isoterma encontrada correspondeu ao Tipo II e os modelos que apresentaram melhor ajuste foram Peleg, Chung-Pfost e GAB.

Tabela 18. Parâmetros dos modelos referentes às isotermas de sorção das cápsulas preparadas com amido hidrolisado com DE igual a 12 com os respectivos valores de R^2 e ERM.

Modelo	Constante	Temperatura			Média
		10 °C	20 °C	30 °C	
BET	C	65,78	14,57	12,76	
	X_m	0,08	0,08	0,07	
	R^2	0,96	0,91	0,87	
	ERM (%)	5,04	4,95	3,94	4,64
GAB	X_m	0,08	0,07	0,06	
	C	85,65	93,76	57,80	
	K	0,78	0,81	0,82	
	ERM (%)	7,81	10,61	18,69	12,37
Oswin	A	0,15	0,13	0,12	
	B	0,25	0,28	0,31	
	R^2	0,99	0,98	0,98	
	ERM (%)	5,01	7,36	7,73	6,70
Chung-Pfost	A	5,90	4,85	4,40	
	B	13,87	13,89	14,53	
	R^2	0,98	0,97	0,97	
	ERM (%)	6,17	8,12	8,18	7,49
Henderson	A	56,67	72,30	53,64	
	B	2,35	2,35	2,10	
	R^2	0,99	0,97	0,97	
	ERM (%)	5,47	8,95	9,26	7,89
Smith	A	0,08	0,07	0,06	
	B	-0,08	-0,08	-0,08	
	R^2	0,98	0,97	0,97	
	ERM (%)	6,48	10,47	10,40	9,12
Peleg	k_1	0,21	0,24	0,19	
	n_1	11,87	15,31	0,61	
	k_2	0,22	0,21	0,25	
	n_2	0,52	0,56	15,09	
	ERM (%)	2,43	3,95	5,09	3,82
Chirife	A	-2,06	-2,19	-2,31	
	B	-0,42	-0,395	-0,43	
	C	0,05	0,02	0,03	
	R^2	0,99	0,98	0,98	
	ERM (%)	5,77	10,13	11,07	8,99

X_m (umidade de monocamada) e A, B, C, K, n são constantes das equações.

A Figura 30 que corresponde à umidade de equilíbrio em função da atividade de água (a_w) (isoterma de sorção) mostra a tendência da isoterma para o Tipo II, sigmoidal, de acordo com a classificação de Brunauer *et al.* (1938). Através da análise do modelo de GAB é possível confirmar que a isoterma encontrada corresponde ao Tipo

II, visto que os valores da constante C foram maiores que 2, e os valores de k permaneceram na faixa entre 0 e 1 (Blahovec, 2004). Este resultado corrobora com os encontrados por Al-Muhtaseb et al. (2004), Van der Berg (1975) e McMinn (2003) que encontraram comportamento Tipo II para as isotermas do amido de batata com alto teor de ailopectina, amido de batata e amido de trigo, respectivamente.

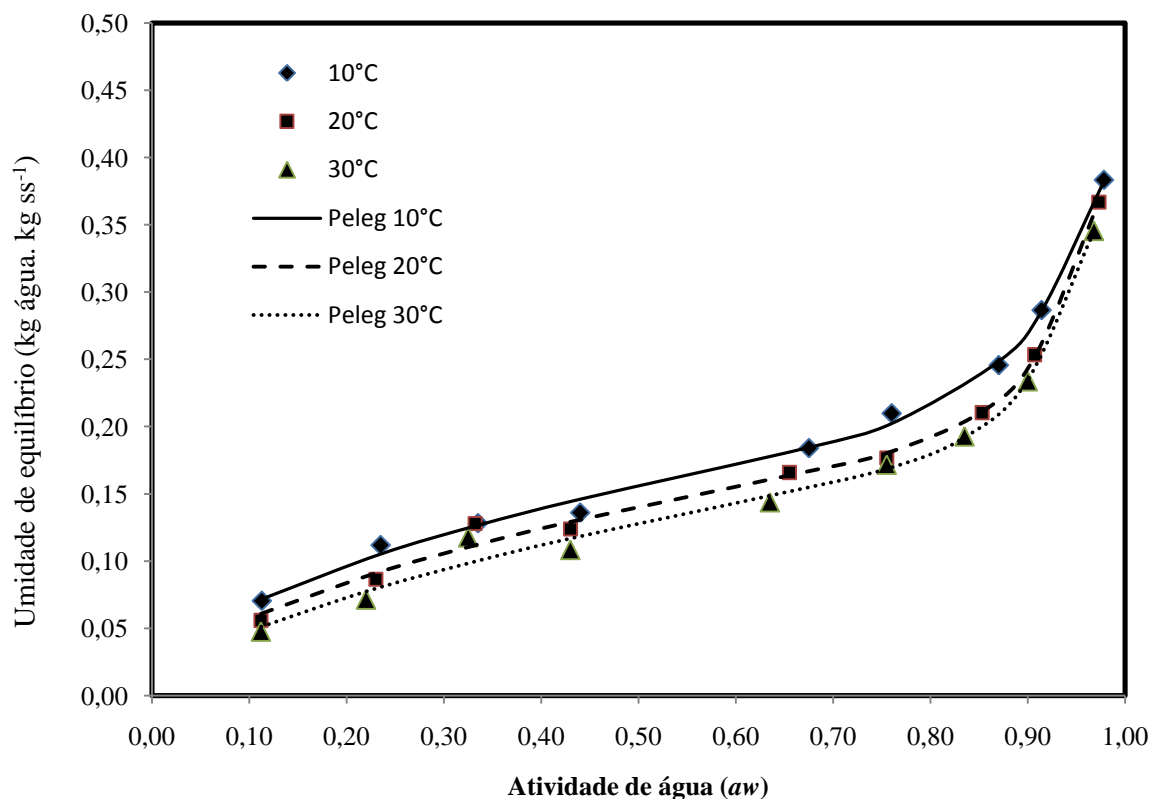


Figura 30. Isotermas de sorção para as cápsulas produzidas com amido hidrolisado DE 12 em diferentes temperaturas. Os símbolos representam os valores experimentais de umidade de equilíbrio (base seca) e as linhas os preditos pelo modelo de Peleg em função da atividade da água (a_w).

Al-Muhtaseb *et al.* (2004) comentaram que, ao tratar de amidos, em baixos valores de atividade de água, ocorre um efeito plastificante das regiões amorfas do grânulo de amido, diminuindo a mobilidade dessas regiões. Em elevadas atividades de água, a umidade causa uma solubilidade do biopolímero com conseqüente redução da cristalinidade e aumento da disponibilidade de grupos polares para estabelecer ligações com a água.

O conteúdo de umidade decresce com o aumento da temperatura, a um mesmo valor de atividade de água, o que indica que as cápsulas tornam-se menos higroscópicas como o aumento da temperatura. Além disso, verificou-se que nem sempre as isotermas

em diferentes temperaturas apresentam separação consistente ao longo de toda a curva. Segundo Palipane e Discroll (1992), sob altas temperaturas, as moléculas de água são ativadas a níveis mais altos de energia, fazendo com que as mesmas se tornem menos estáveis, levando ao rompimento das ligações estabelecidas com os sítios de sorção do alimento, resultando em uma redução da umidade.

Os valores de umidade de monocamada (X_m) obtidos variaram entre 0,06 e 0,08 g H₂O/g de sólidos pelo modelo de GAB e de 0,07 a 0,08 para o modelo de BET. Este parâmetro é importante para prever as condições de armazenamento e a deterioração de alimentos, visto que ele é um indicador da disponibilidade dos sítios polares para estabelecer ligações com a água (Chung e Pfof, 1976).

Apesar dos valores encontrados para X_m serem muito próximos na faixa de temperatura estudada, observou-se que estes valores apresentaram a tendência de diminuir com o aumento da temperatura, fato que pode ser explicado pelas mudanças estruturais no amido que compõe as microcápsulas. Com o aumento da temperatura, o grau de ligações de hidrogênio é reduzido, diminuindo a disponibilidade dos sítios de sorção para possíveis ligações com a água (Westgate *et al.*, 1992). Os resultados encontrados foram similares aos reportados por Thys *et al.* (1998) que relatam valores de monocamada entre 0,07 e 0,09 g H₂O/g de sólidos, para o amido de pinhão entre 10 e 40°C.

Na Figura 31 estão mostrados os valores de entalpia diferencial de adsorção (Eq. 11) em função da umidade de equilíbrio. Nota-se que a baixos conteúdos de umidade, o calor de sorção começa a aumentar drasticamente, e com o aumento da umidade, decresce rapidamente até a curva tornar-se assintótica. Este comportamento pode ser explicado porque em baixos teores de umidade, ocorre uma forte interação entre o produto e a água contida nele, sendo preciso altos valores de energia (calor de sorção) para retirar a água presente nas amostras (Shivhare *et al.*, 2004).

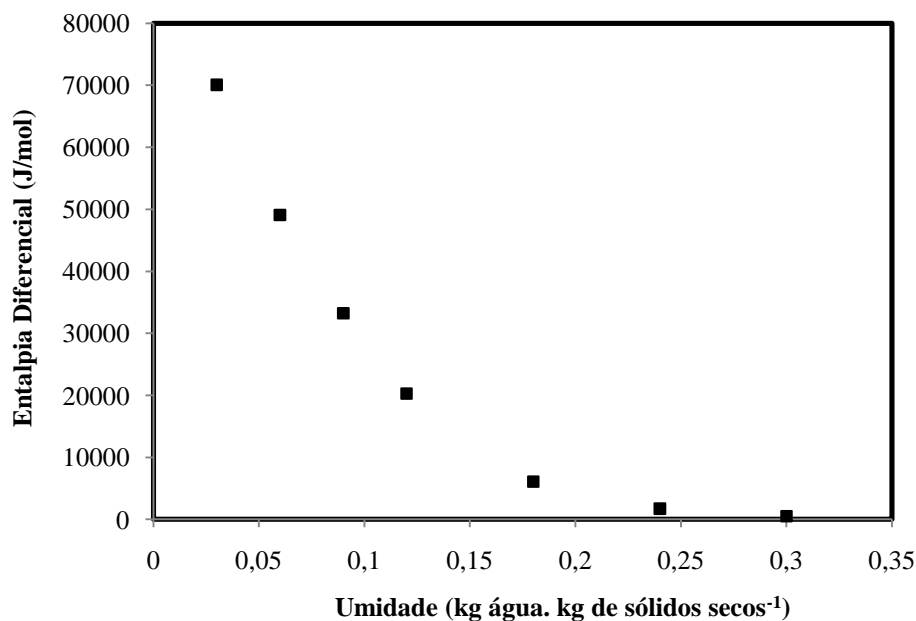


Figura 31. Entalpia diferencial de adsorção das cápsulas liofilizadas preparadas com amido de pinhão hidrolisado DE 12 em função da umidade de equilíbrio.

A Figura 32 apresenta os valores de entropia de sorção em função da umidade de equilíbrio para as cápsulas liofilizadas preparadas com amido hidrolisado. Percebe-se que assim como o encontrado para a entalpia diferencial de sorção, a entropia diferencial de sorção aumenta com o decréscimo da umidade de equilíbrio, devido às mesmas razões citadas anteriormente.

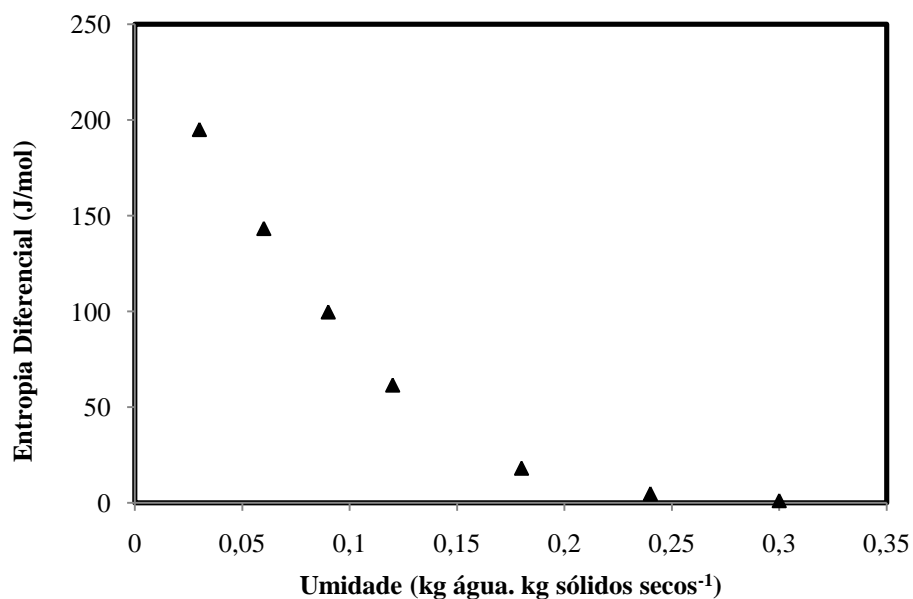


Figura 32. Entropia diferencial de adsorção das cápsulas liofilizadas preparadas com amido de pinhão hidrolisado DE 12 em função da umidade de equilíbrio.

5.3 Estabilidade das microcápsulas preparadas com amido nativo e hidrolisado

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados relativos à estabilidade do β -caroteno livre e encapsulado nos diversos materiais de parede testados em diferentes condições de estocagem.

Na Figura 33 estão apresentados os valores experimentais e preditos por um modelo cinético de primeira ordem para o β -caroteno livre em diferentes condições de armazenamento: 10°C e 30°C na ausência de luz e na temperatura ambiente em presença de luz. Observa-se que a temperatura influenciou na estabilidade, assim como a presença da luz que diminuiu consideravelmente a vida útil do β -caroteno.

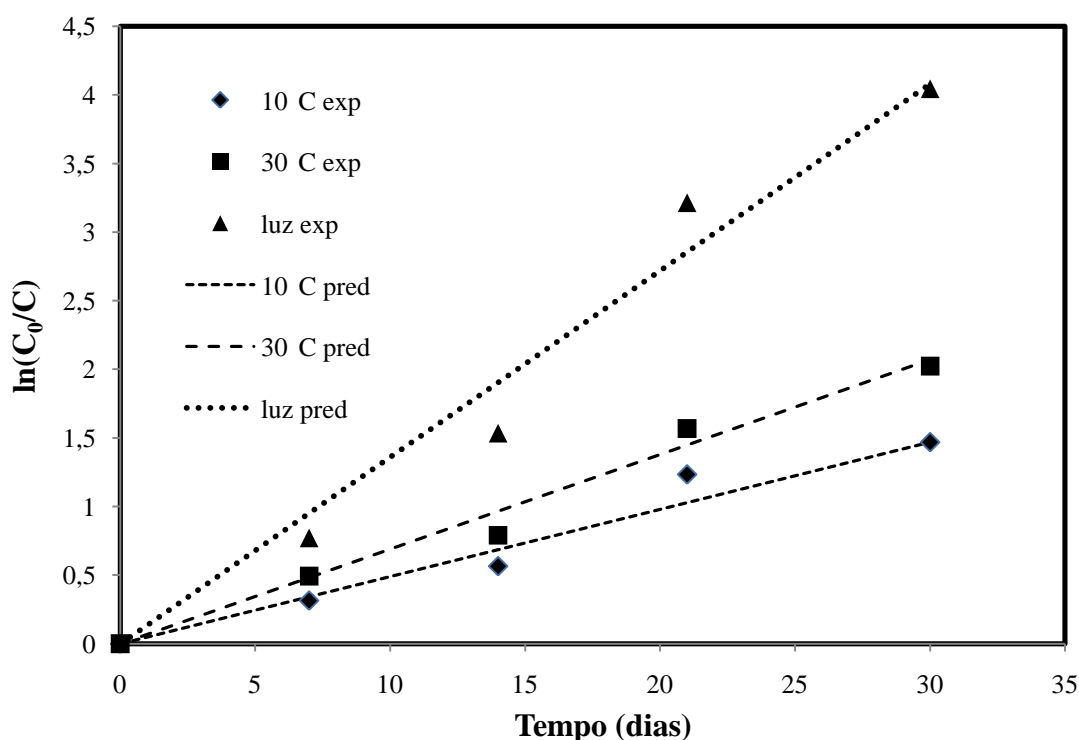


Figura 33. Valores experimentais e preditos por um modelo cinético de primeira ordem referente à concentração de β -caroteno em pó, livre, a 10°C e 30°C na ausência de luz e exposto à luz a temperatura ambiente (25±2).

A Tabela 19 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos e estatísticos encontrados no estudo da estabilidade do β -caroteno livre (não encapsulado), em ambientes aeróbios, através de um modelo cinético de primeira ordem. Conforme Chen *et al.* (2009), vários estudos estabeleceram uma descrição da degradação de carotenóides através de um modelo de cinética de primeira ordem. Em um estudo feito por Henry *et al.* (1998) no qual os carotenóides *trans*- β -caroteno, *9-cis*- β -caroteno,

licopeno e luteína foram avaliados quanto à degradação oxidativa e térmica em sistema modelo oleoso, a cinética de degradação dos carotenóides obedeceu a um modelo de primeira ordem.

Tabela 19. Resultados da regressão linear quanto à degradação de β -caroteno livre utilizando modelo cinético de primeira ordem, nas diferentes condições testadas temperaturas de 10 e 30°C na ausência de luz e em presença de luz a 25±2°C.

Amostra	Condição	Modelo de primeira ordem		
		k_1 *(dias ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dias)	R^2
β -caroteno livre	Luz*	0,136	5	0,974
	30 °C**	0,069	10	0,985
	10 °C**	0,049	14	0,977

*Temperatura ambiente 25 ± 2 °C;

** Experimentos realizados no escuro.

O tempo de meia-vida (Eq.18) encontrado para o β -caroteno livre foi de apenas 5 dias quando o mesmo foi exposto à luz UV, e de 10 e 14 dias, quando armazenado na ausência de luz a 30°C e 10°C, respectivamente. Foram encontrados outros trabalhos que relatam a meia-vida desse composto, porém em diferentes condições experimentais. Wagner e Warthesen (1995) encontraram uma meia vida de 2,4 dias, quando o β -caroteno foi estocado a 21°C em condições aeróbias. Ferreira (2001) ao estudar a cinética de degradação do β -caroteno, utilizando sistemas modelos, encontrou perdas de 71 % em experimentos realizados na presença de luz utilizando amido de milho como sistema modelo e 92% utilizando fécula de batata, após 20 dias de experimentos. Shu *et al.* (2006) encontraram uma meia-vida de 20 dias para o licopeno livre armazenado a 0°C.

A Figura 34 apresenta os valores experimentais e preditos por um modelo cinético de primeira ordem da composição do β -caroteno encapsulado nos diferentes materiais de parede e estocado a 10°C em condições aeróbias. Observa-se que nessa temperatura já foi possível perceber uma notável diferenças entre os agentes testados, visto que as cápsulas compostas por amido nativo conferiram menor proteção ao composto encapsulado enquanto as cápsulas preparadas com amido hidrolisado DE 12 conferiram maior estabilidade. As figuras correspondentes ao comportamento do β -caroteno encapsulado em função do tempo nas outras condições testadas estão expostas no Apêndice F.

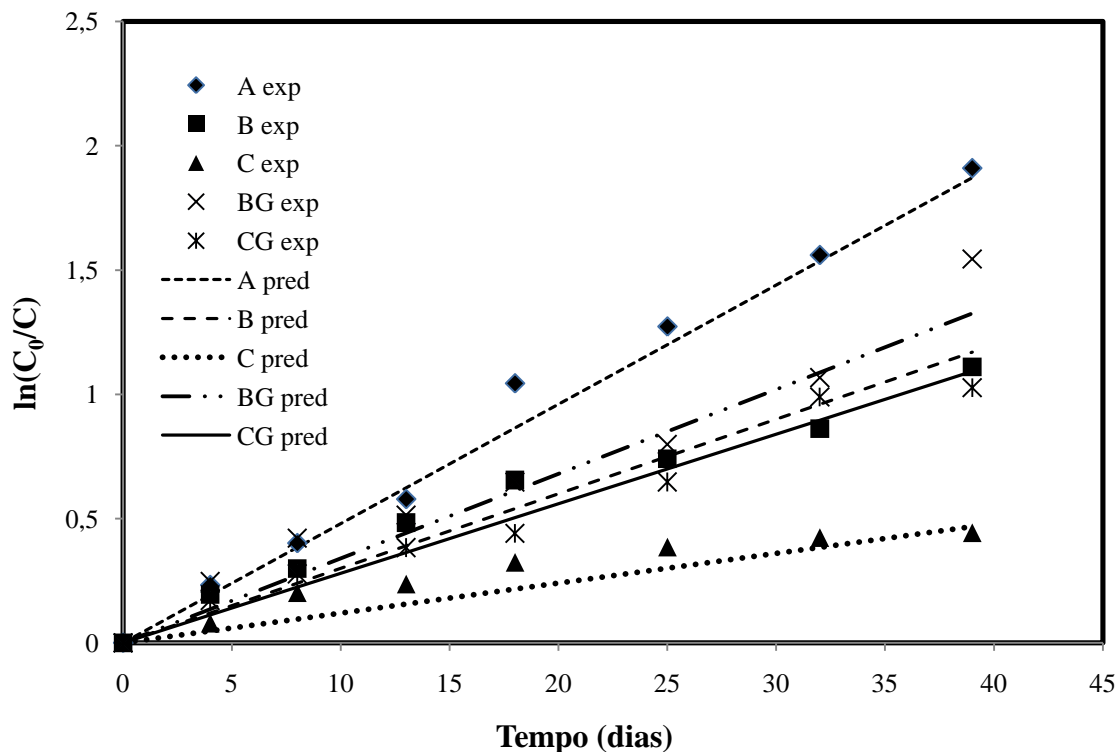


Figura 34. Valores experimentais e preditos por um modelo cinético de primeira ordem referente à concentração do β -caroteno encapsulado nos diferentes materiais de parede e estocado a 10°C em condições aeróbias.

A Tabela 20 mostra os parâmetros cinéticos de primeira ordem encontrados para as cápsulas estocadas a 10 e 30°C, na presença do oxigênio e em ambiente saturado com nitrogênio. Observando os resultados, foi possível verificar que na presença do oxigênio, o k da reação aumentou consideravelmente, ou seja, o composto encapsulado degradou mais rapidamente em ambas as temperaturas testadas. O amido nativo não mostrou ser um bom agente encapsulante, visto que as amostras contendo amido nativo como material de parede apresentaram maiores velocidades de reação quando comparada às outras amostras. Além disso, a 30°C a velocidade de reação foi maior que a do β -caroteno livre. As cápsulas que apresentaram maiores tempos de meia-vida corresponderam às amostras contendo amido hidrolisado DE 12, pois mesmo na presença de oxigênio, o tempo de meia-vida do β -caroteno encapsulado foi de 57,8 e 38,5 dias, a 10 e 30°C, respectivamente.

As cápsulas feitas com amido hidrolisado DE 6 promoveram uma menor estabilidade do β -caroteno quando comparadas às cápsulas preparadas com amido DE 12, visto que amidos hidrolisados com menores DE contêm uma maior proporção de

cadeias longas de sacarídeos que formam uma barreira inflexível e mais permeável ao oxigênio, permitindo uma maior oxidação e degradação do composto encapsulado (Wagner e Warthesen, 1995). Tornou-se difícil comparar o material de parede testado com outros, visto que diferentes técnicas e diversas condições de armazenamento são testadas para encapsular carotenóides, porém pôde-se concluir que a hidrólise aumentou consideravelmente o potencial do amido como agente encapsulante.

Tabela 20. Resultados da regressão linear, quanto à degradação de β -caroteno nas cápsulas preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG), utilizando modelos cinéticos de primeira ordem, estocado a 10 e 30°C em condições ambientais e em atmosferas de nitrogênio.

Amostra	Condição testada	Nitrogênio			Ambiente (O ₂)		
		k ₁ (dias ⁻¹)	t _{1/2}	R ²	k ₁ (dias ⁻¹)	t _{1/2}	R ²
A	10°C	0,035	19,80	0,962	0,048	14,44	0,960
	30°C	0,051	13,59	0,974	0,076	9,12	0,977
B	10°C	0,017	40,77	0,983	0,030	23,11	0,937
	30°C	0,029	23,90	0,961	0,041	16,91	0,930
BG	10°C	0,018	38,51	0,964	0,034	20,39	0,941
	30°C	0,049	14,15	0,944	0,061	11,36	0,953
C	10°C	0,01	69,31	0,941	0,012	57,76	0,904
	30°C	0,015	46,21	0,981	0,018	38,51	0,969
CG	10°C	0,016	43,32	0,978	0,028	24,75	0,972
	30°C	0,037	18,73	0,953	0,051	13,59	0,946

Wagner e Warthesen (1995) realizaram testes com amidos hidrolisados de diferentes graus de DE (4, 15, 25 e 36,5) para encapsular carotenóides através da atomização e encontraram uma estabilidade superior a 90 % para o α e β -caroteno armazenados a 37 °C após 7 semanas, em condições anaeróbias, ao utilizar amido com DE 36,5 como agente encapsulante. Sutter *et al.* (2006) também estudaram a estabilidade do β -caroteno e reportaram que, a 25°C, esse composto microencapsulado em uma matriz de manitol-fosfato pela técnica da liofilização, apresentou perdas de 70% em ambientes com 11% de umidade relativa e perda quase total em ambientes com 44 % de umidade após 63 dias.

Como o oxigênio é um fator extremamente importante quando trata-se da estabilidade de carotenóides (Rodriguez-Amaya, 1999; Fennema, 2000), cabe ressaltar que os trabalhos citados a seguir foram feitos em condições aeróbias. Desobry *et al.* (1999) utilizaram matrizes de maltodextrina com DE 25 para encapsular β -caroteno, e

estudaram a estabilidade dos pós nas temperaturas de 25, 35 e 45°C. A 25°C o sistema com 100 % maltodextrina DE 25 apresentou uma meia-vida de 6 semanas. O melhor resultado foi encontrado para o sistema com 82 % de maltodextrina DE 4 e 18 % de glicose, visto que a meia-vida foi de 17 semanas. Neste estudo, os autores concluíram que a adição de mono e dissacarídeos à maltodextrina reduziu o tamanho dos poros da rede de maltodextrina, limitando a difusão do oxigênio e protegendo o β -caroteno.

Desobry *et al.*(1997) também encapsularam β -caroteno em maltodextrina DE 25 através da liofilização. O mesmo atingiu uma meia-vida de 6 semanas quando estocado a 25°C em ambiente com umidade relativa de 32%. No estudo de estabilidade de licopeno microencapsulado por *spray drying*, utilizando goma arábica como material de parede, Matioli e Rodriguez-Amaya (2002) constataram que no 18º dia, houve perda de 50% deste carotenóide armazenado à temperatura ambiente. Shu *et al.* (2006) avaliaram a estabilidade de microcápsulas de licopeno em gelatina e sacarose por *spray drying*, armazenadas a 0 °C em sacos plásticos transparentes e constataram que houve perda de apenas cerca de 15% após 28 dias.

Os resultados encontrados para as cápsulas expostas à luz UV e armazenadas no escuro, mostrando os parâmetros cinéticos de primeira ordem estão expostos na Tabela 21. A ação da luz aumentou consideravelmente o k da reação quando comparado ao encontrado nas amostras armazenadas no escuro e nas outras condições testadas (10 e 30°C). O β -caroteno encapsulado com amido nativo apresentou velocidade de degradação similar ao composto livre, o que indica que grande parte do composto está presente na superfície, comprovando a baixa capacidade do amido sem modificação de formar filme

A Figura 35 apresenta o comportamento do β -caroteno encapsulado com amido hidrolisado DE 12 nas diferentes condições testadas. Verificou-se que mesmo com esse material de parede, a luz influenciou consideravelmente na estabilidade do núcleo. A menor estabilidade do composto encapsulado frente a esse fator pode estar relacionada com reações de isomerização e, sobretudo pela potencialização das reações de auto-oxidação e foto-oxidação (Nachtigal *et al.*, 2009).

Tabela 21. Resultados da regressão linear quanto à degradação de β -caroteno nas cápsulas preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG), utilizando um modelo cinético de primeira ordem, para as amostras expostas à luz e armazenadas no escuro à temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$), em condições ambientais de oxigênio.

Amostra	Condição	Modelo de primeira ordem		
		$k_1(\text{dias}^{-1})$	$t_{1/2}$	R^2
A	Luz	0,149	4,65	0,971
	Escuro	0,074	9,37	0,912
B	Luz	0,085	8,15	0,960
	Escuro	0,031	22,36	0,973
BG	Luz	0,101	6,86	0,951
	Escuro	0,057	12,16	0,975
C	Luz	0,025	27,73	0,950
	Escuro	0,016	43,32	0,918
CG	Luz	0,094	7,37	0,931
	Escuro	0,037	18,73	0,957

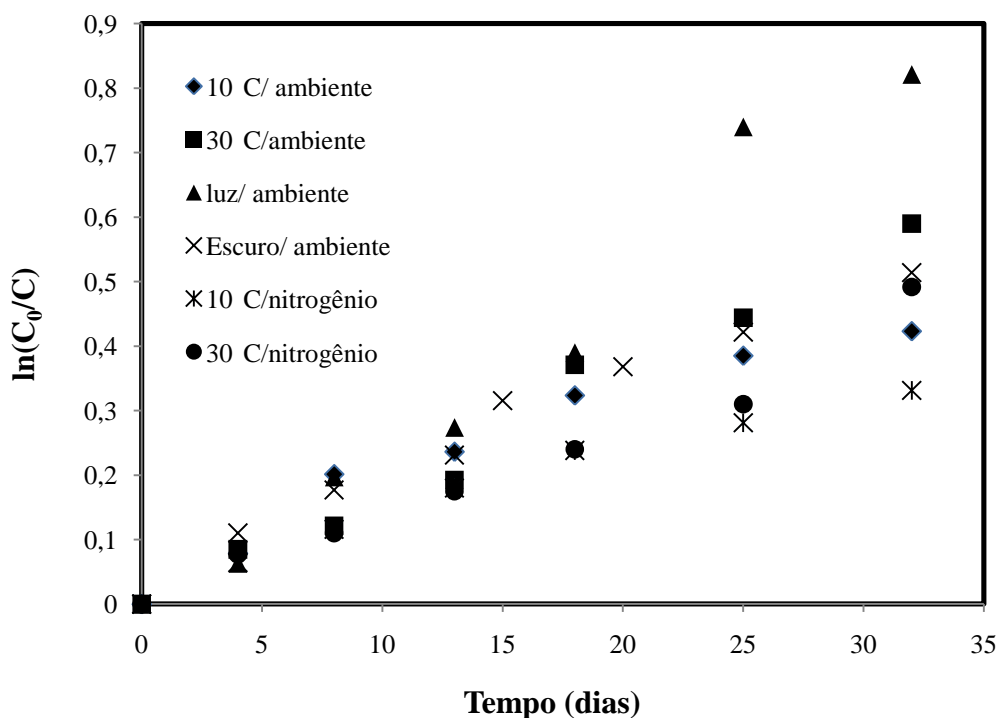


Figura 35. Valores experimentais para o β -caroteno encapsulado com amido hidrolisado DE 12 e estocado em diferentes condições: 10°C e 30°C na presença e ausência de oxigênio, e na presença e ausência de luz com oxigênio à temperatura ambiente.

Wagner e Warthesen (1995) encontraram perdas de 90% para o α e β -caroteno encapsulado com amido hidrolisado DE 4, na presença da luz, e 70 % utilizando amido DE 36,5. Os autores, além de observarem o efeito da luz, verificaram que o amido com maior grau de hidrólise promoveu maior estabilidade ao núcleo, resultados similares aos encontrados neste trabalho. Outros carotenóides também apresentaram sensibilidade quando estocados na presença da luz (Prentice-Hernández e Rusig, 1999; Matioli e Rodriguez-Amaya, 2003; Nachtigal *et al.*, 2009).

Prentice-Hernández e Rusig (1999) estudaram a estabilidade à luz do extrato de bixina microencapsulado em maltodextrina em relação ao extrato base. A perda de bixina foi de quase a metade no extrato base, no primeiro dia de exposição à luz, e de 2 dias no extrato microencapsulado. Porém, após 30 dias a bixina remanescente no extrato microencapsulado foi 17,87% e no extrato base foi de apenas 1,69%. Já no caso das amostras colocadas na ausência de luz, a quantidade de bixina remanescente após 30 dias foi de 96 % no extrato microencapsulado. Matioli e Rodriguez-Amaya (2002) encapsularam licopeno em goma arábica e maltodextrina através da liofilização e encontraram um tempo de meia vida de 13 dias no escuro e 10 dias na presença de luz, em temperatura ambiente.

Bons resultados foram obtidos por Matioli e Rodriguez-Amaya (2003) ao encapsular licopeno em γ -ciclodextrina, visto que o pigmento se manteve estável durante 40 dias, tanto na presença como na ausência de luz, em ambientes com temperaturas variando de 25 a 35 °C.

A Tabela 22 apresenta os resultados referentes à estabilidade do β -caroteno verificada no presente com os resultados obtidos por outros autores ao encapsular carotenóides em diferentes materiais de parede e técnicas encapsulantes.

Tabela 22. Quadro comparativo referente à estabilidade de carotenóides encapsulados em diferentes materiais de parede, expostos a diversas condições de estocagem.

Autor	Carotenóide encapsulado	Material de parede	Técnica	Condição de estocagem	Perdas durante a estocagem
Presente trabalho	β -caroteno	amido de pinhão DE 12	liofilização	luz - 4 semanas (condições aeróbias)	perda de 50%
Presente trabalho	β -caroteno	amido de pinhão DE 12	liofilização	escuro - 43 dias (condições aeróbias)	perda de 50%
Presente trabalho	β -caroteno	amido de pinhão DE 12	liofilização	10°C - 57 dias (condições aeróbias)	perda de 50%
Presente trabalho	β -caroteno	amido de pinhão DE 12	liofilização	30°C - 38 dias (condições aeróbias)	perda de 50%
Sutter <i>et al.</i> (2006)	β -caroteno	matriz manitol fosfato	liofilização	25°C - 63 dias (44% de UR)	perda quase total
Matioli e Rodriguez-Amaya (2003)	licopeno	γ -ciclodextrina	inclusão molecular	Luz - 40 dias (condições aeróbias)	perda menor que 1 %
Matioli e Rodriguez-Amaya (2002)	licopeno	goma arábica e maltodextrina	liofilização	Luz - 10 dias (condições aeróbias)	perda de 50 %
Matioli e Rodriguez-Amaya (2002)	licopeno	goma arábica	atomização	25 °C - 18 dias (condições aeróbias)	perda de 50 %
Desobry <i>et al.</i> (1999)	β -caroteno	82% de maltodextrina + 18% de glicose	atomização	25 °C -17 semanas (condições aeróbias)	perda de 50 %
Desobry <i>et al.</i> (1997)	β -caroteno	maltodextrina DE 25	liofilização	25 °C - 6 semanas (condições aeróbias)	perda de 50 %
Wagner e Warthesen (1995)	α e β -caroteno	amido de milho DE 4	atomização	Luz - 8 semanas	perda de 90 %
Wagner e Warthesen (1995)	α e β -caroteno	amido de milho DE 36,4	atomização	37°C - 7 semanas	perda menor que 10 %

Cabe ressaltar que os experimentos de caracterização e estabilidade executados neste trabalho não são suficientes para provar que o amido hidrolisado de pinhão pode ser utilizado como agente encapsulante em sistemas alimentícios. Logo são necessários mais testes que permitam a confirmação dessa hipótese. São necessários testes que comprovem a aplicabilidade deste tipo de material de parede em sistemas alimentícios, assim como a liberação do composto ativo.

O modelo de Weibull (Eq.19) foi utilizado a fim de verificar se os dados experimentais se ajustariam a um modelo matemático diferente dos tradicionalmente empregados para modelagem de degradação de carotenóides. Esse modelo é

amplamente utilizado para ajustar dados de inativação térmica de enzimas bem como a degradação térmica de alguns compostos como a clorofila e a tiamina (Corradini e Peleg, 2004).

O modelo de Weibull foi adaptado aos dados experimentais utilizando o amido DE 12 como material de parede. Os valores encontrados para os parâmetros b e n , bem como o coeficiente de determinação (R^2) estão expostos na Tabela 23.

Tabela 23. Resultados da regressão linear quanto à degradação de β -caroteno nas cápsulas feitas com amido hidrolisado DE 12, expostas em diferentes condições de estocagem, utilizando o modelo de Weibull.

Condição	Distribuição de Weibull		
	b	n	R^2
10°C - ambiente	0,050	0,615	0,977
30°C - ambiente	0,010	1,182	0,980
Escuro (25°C) - ambiente	0,036	0,762	0,992
Luz (25°C) - ambiente	0,014	1,197	0,983
10°C - nitrogênio	0,026	0,742	0,994
30°C - nitrogênio	0,012	1,036	0,979

Tentou-se ajustar os parâmetros b e n obtidos nas temperaturas de 10, 25 e 30°C ao modelo log-logístico (Eq.20), porém não foi possível ajustar o parâmetro b a esse modelo, visto que os coeficientes foram negativos e o parâmetro n apresentou um ajuste pobre ($R^2 = 0,761$) com k' e T_c iguais a $0,047^\circ\text{C}^{-1}$ e $16,165^\circ\text{C}$, respectivamente. Quando esse modelo não apresenta um bom ajuste, é possível utilizar outro em particular ou uma expressão baseada no mínimo de parâmetros (Peleg, 2002). Cabe ressaltar que nem sempre o $b(T)$ aumenta com a temperatura, visto que outros autores também não conseguiram adaptar esse parâmetro ao modelo log-logístico.

Shalini *et al.* (2008) e Chen e Hoover (2004) encontraram modelos polinomiais para ajustar os coeficientes. Shalini *et al.* (2008) ajustaram os dados relativos à inativação da peroxidase a um polinômio de ordem quatro e Chen e Hoover (2004) encontraram uma equação linear ao inativar *Listeria monocytogenes*. Além disso, também é importante ressaltar a relação entre $b(T)$ e $n(T)$ com a temperatura. Neste trabalho com o aumento da temperatura, ocorreu decréscimo dos valores de b e aumento dos valores de n .

Os valores de n variaram de 0,615 a 1,182, na distribuição de Weibull, $n < 1$ indica que a curva semi-logarítmica tem uma concavidade para baixo, e $n > 1$ indica que a curva tem um comportamento de “ombro” com a concavidade para cima (Peleg, 2003). Observou-se que a 10 e 25°C o n foi menor que 1 e a 30°C o n foi maior que 1, indicando que inicialmente existe uma maior resistência à degradação, e com o tempo ocorre um aumento na sensibilidade do composto (Figura 36). Os modelos de reação de primeira ordem e de Weibull renderam um bom ajuste dos dados, porém o modelo de Weibull apresentou maiores valores de R^2 (0,97-0,99) quando comparados aos encontrados no modelo de primeira ordem (0,90-0,98). Os valores χ^2 variaram de 6×10^{-5} a 9×10^{-4} para a distribuição de Weibull e entre 3×10^{-4} a $1,2 \times 10^{-3}$ para o modelo de primeira ordem e os valores de ERM para Weibull também foram inferiores aos do modelo de primeira ordem, variando de 0,67 a 3,58 e 1,77 a 4,16, respectivamente. Contudo, conclui-se que o modelo de Weibull mostrou ser um bom modelo de ajuste, visto que o mesmo apresentou melhores parâmetros estatísticos que o modelo de primeira ordem, mais utilizado na degradação de carotenóides.

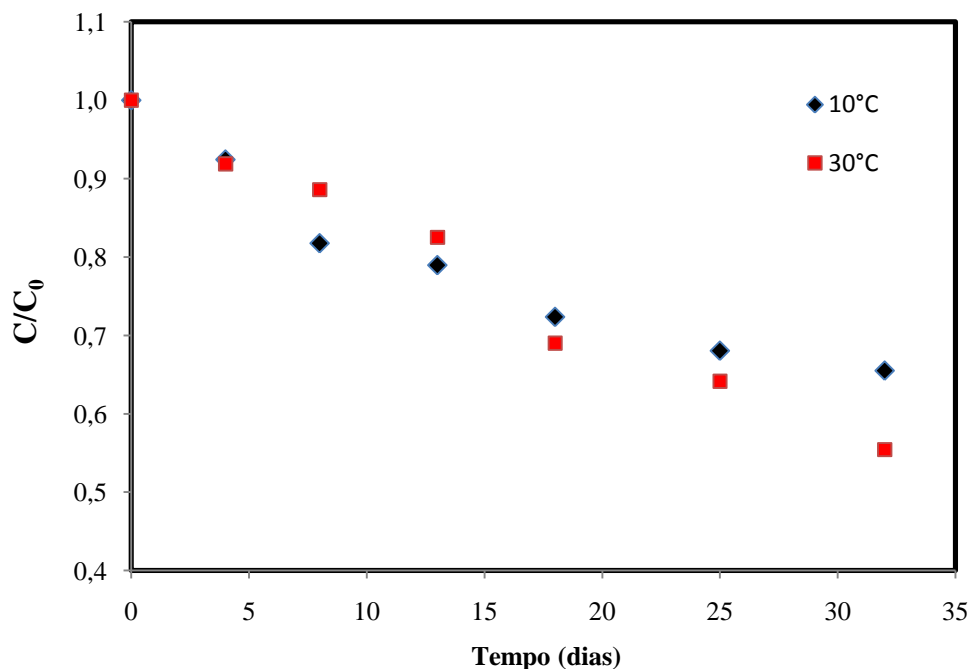


Figura 36. Valores experimentais referentes à concentração do β -caroteno encapsulado com amido hidrolisado DE 12 e estocado a 10 e 30°C em condições ambientais de oxigênio.

5.4 Análise colorimétrica

Através da colorimetria foi possível avaliar as alterações qualitativas sofridas pelo pigmento microencapsulado nos diferentes materiais de parede testados nas condições avaliadas, visto que ocorreram mudanças consideráveis na cor das amostras (Apêndice G) assim como nas coordenadas analisadas. O β -caroteno puro tem uma cor vermelha escura enquanto o amido é branco, quando misturados e secos, as cápsulas tiveram valores iniciais de L^* de $69,12 \pm 0,25$ a $72,34 \pm 0,16$, de a^* de $20,45 \pm 0,16$ a $23,14 \pm 0,42$ e de b^* de $12,13 \pm 0,34$ a $16,33 \pm 0,67$.

A Figura 37 apresenta o comportamento do parâmetro colorimétrico L^* (luminosidade) em função do tempo, referente às cápsulas armazenadas no escuro e expostas à luz UV, na presença do oxigênio. Foi constatado um aumento nos valores desse parâmetro no decorrer dos experimentos, indicando que as amostras foram tornando-se mais claras, visto que essa componente cromática é a medida de cor no eixo preto-branco. As amostras que apresentaram maior aumento no valor de L^* correspondem às cápsulas preparadas com amido nativo, enquanto as cápsulas preparadas com amido hidrolisado apresentaram menor aumento desse parâmetro. Quando expostas à luz UV, as cápsulas preparadas com amido nativo apresentaram maiores valores de L^* , diferente das cápsulas preparadas com amido hidrolisado que apresentaram valores semelhantes aos encontrados nas amostras armazenadas no escuro.

O comportamento do parâmetro colorimétrico a^* em função do tempo, referente às cápsulas colocadas no escuro e expostas à luz UV, está apresentado na Figura 38. Essa coordenada sofreu tendência de redução nos seus valores, indicando que ao longo do tempo a contribuição da coloração vermelha foi reduzindo, devido à degradação do composto encapsulado (Thiagu *et al.*, 1993). As amostras contendo amido nativo apresentaram maior decaimento desses valores, ou seja, essas amostras foram as que mais perderam a coloração rosada e conseqüentemente, as que mais sofreram degradação.

O comportamento da coordenada cromática b^* em função do tempo está apresentado na Figura 39. Esse parâmetro não foi um bom indicador da retenção de carotenóides, visto que ele caracteriza o eixo azul-amarelo e essas cores não foram dominantes nas amostras. Durante a estocagem, aconteceram pequenas oscilações nos valores de b^* que podem estar relacionadas com as hipóteses de isomerização e

reisomerização, visto que as reações de auto-oxidação e reversão são competitivas e se a forma *trans* degrada a forma *cis* também o faz (Boscovic, 1979; Nachtigal *et al.*, 2009). Resultados semelhantes foram reportados por Desobry *et al.* (1997) e Desobry *et al.* (1999) que avaliaram colorimetricamente β -caroteno encapsulado em sistemas de maltodextrina e observaram que o L^* (luminosidade) e o a^* (vermelhidão) são os parâmetros mais sensíveis na retenção de β -caroteno durante a estocagem, ocorrendo aumento dos valores de L^* e decaimento dos valores de a^* . Sutter *et al.* (2007) também analisaram colorimetricamente o β -caroteno encapsulado em matrizes de manitol-fosfato e concluíram que a coordenada a^* foi o parâmetro mais representativo das mudanças de cor ocorridas nas amostras, ao contrário do b^* que não foi um bom indicador.

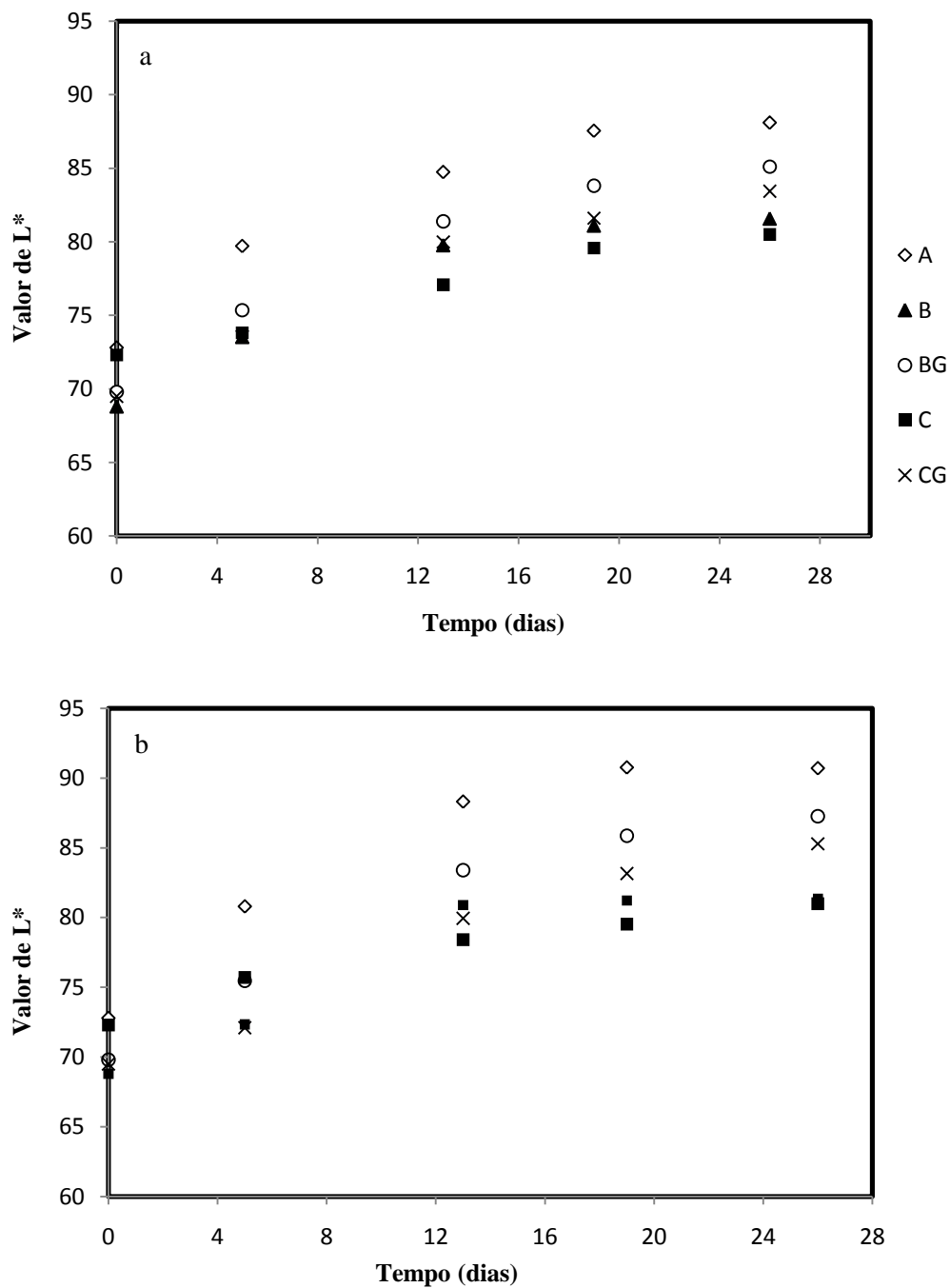


Figura 37. Mudanças ocorridas no parâmetro de cor L^* em função do tempo, para as cápsulas preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG), armazenadas no escuro (a) e expostas à luz UV (b) a temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

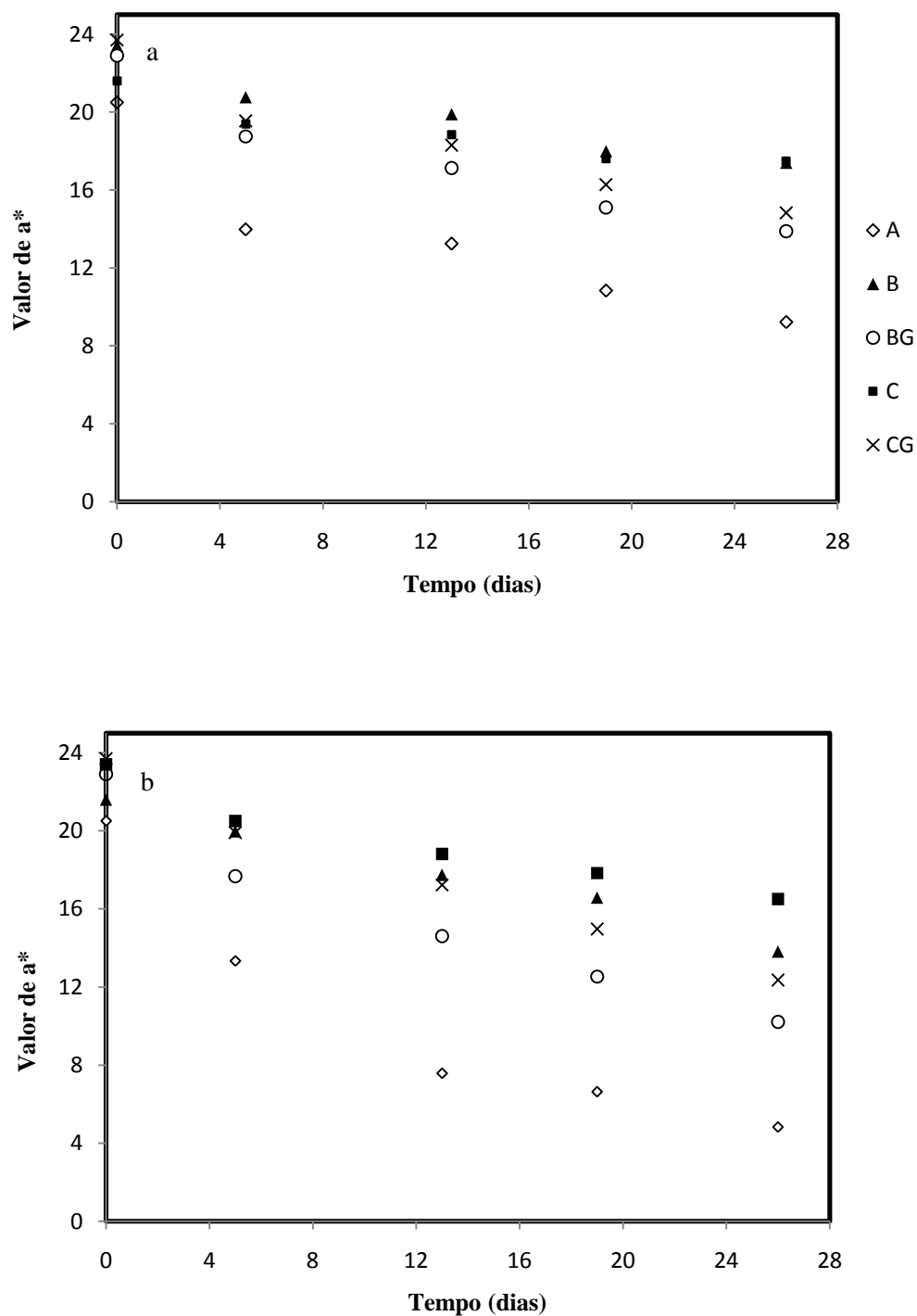


Figura 38. Mudanças ocorridas no parâmetro de cor a^* em função do tempo, para as cápsulas preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG), armazenadas no escuro (a) e expostas à luz UV (b) a temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

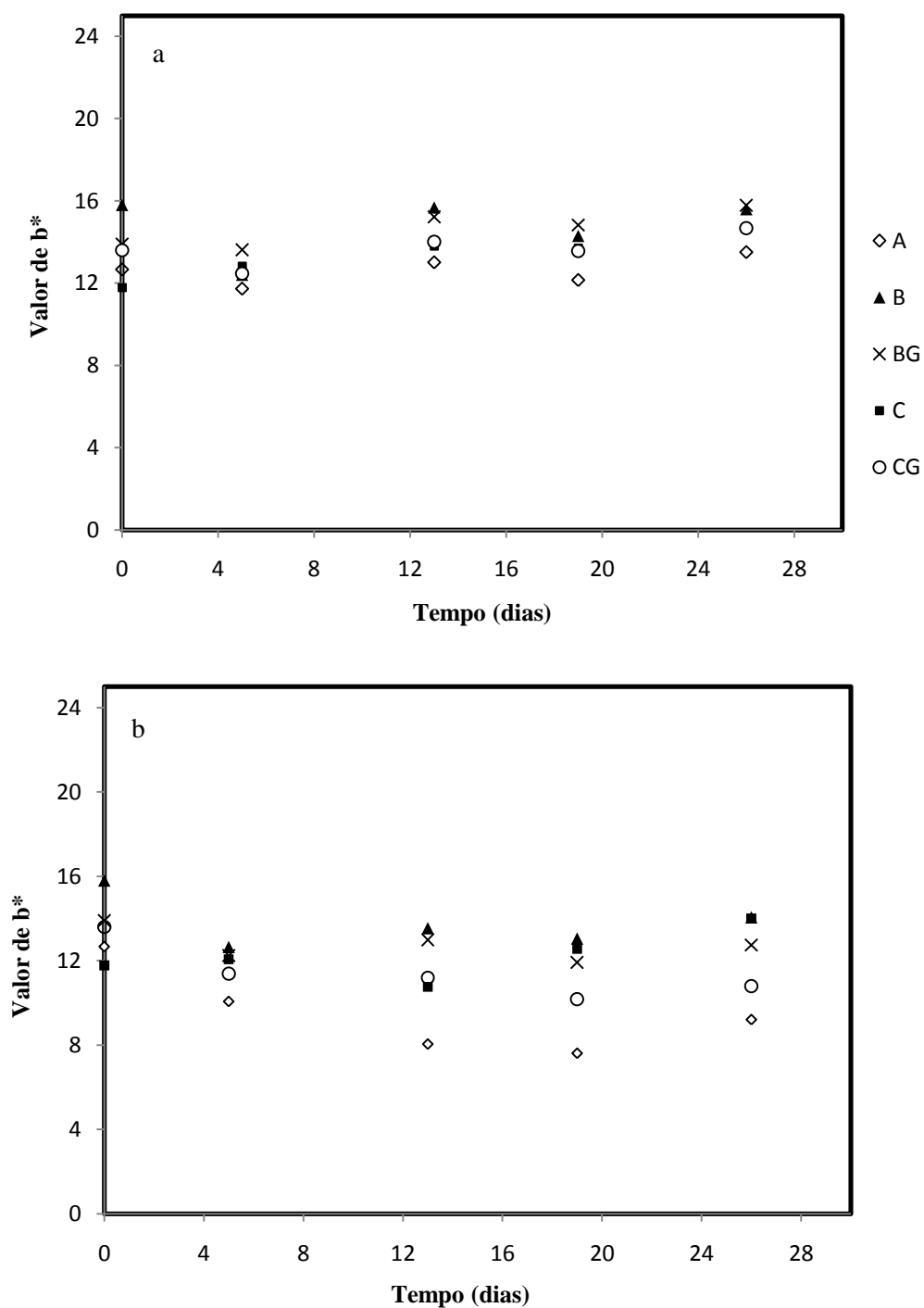


Figura 39. Mudanças ocorridas no parâmetro de cor b^* em função do tempo, para as cápsulas preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE12 sem (C) e com gelatina (CG), armazenadas no escuro (a) e expostas à luz UV (b) a temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

O comportamento do ângulo de tonalidade (H^*) está apresentado na Figura 40 e as mudanças ocorridas no Chroma (C^*) em função do tempo, referente às cápsulas colocadas armazenadas no escuro e expostas à luz UV estão apresentadas na Figura 41.

Para a análise do ângulo de tonalidade, o $H^*= 0^\circ$ é fixado no eixo horizontal a+ (vermelho) e, girando no sentido anti-horário, tem-se, $H^*= 90^\circ$ (amarelo), $H^*= 180^\circ$ (verde) e $H^*=270^\circ$ (azul) (Alves *et al.*, 2008). Sabendo que o H^* entre 0° e 90° caracteriza a qualidade da cor de vermelho a amarelo, pode-se afirmar que ocorreu perda da coloração avermelhada das amostras, visto que ocorreu um acréscimo nos valores da tonalidade com o tempo (Alves *et al.*, 2008). Já para o Chroma ou grau de saturação da cor, ocorreu declínio dos valores com o tempo. Observou-se maior decaimento desse parâmetro nas cápsulas expostas à luz UV, principalmente, as preparadas com amido nativo, indicando que estas amostras sofreram maiores mudanças na matiz original. Os comportamentos desses dois parâmetros indicaram que mudanças ocorreram na cor das amostras ao longo do tempo e, conseqüentemente, no conteúdo das mesmas.

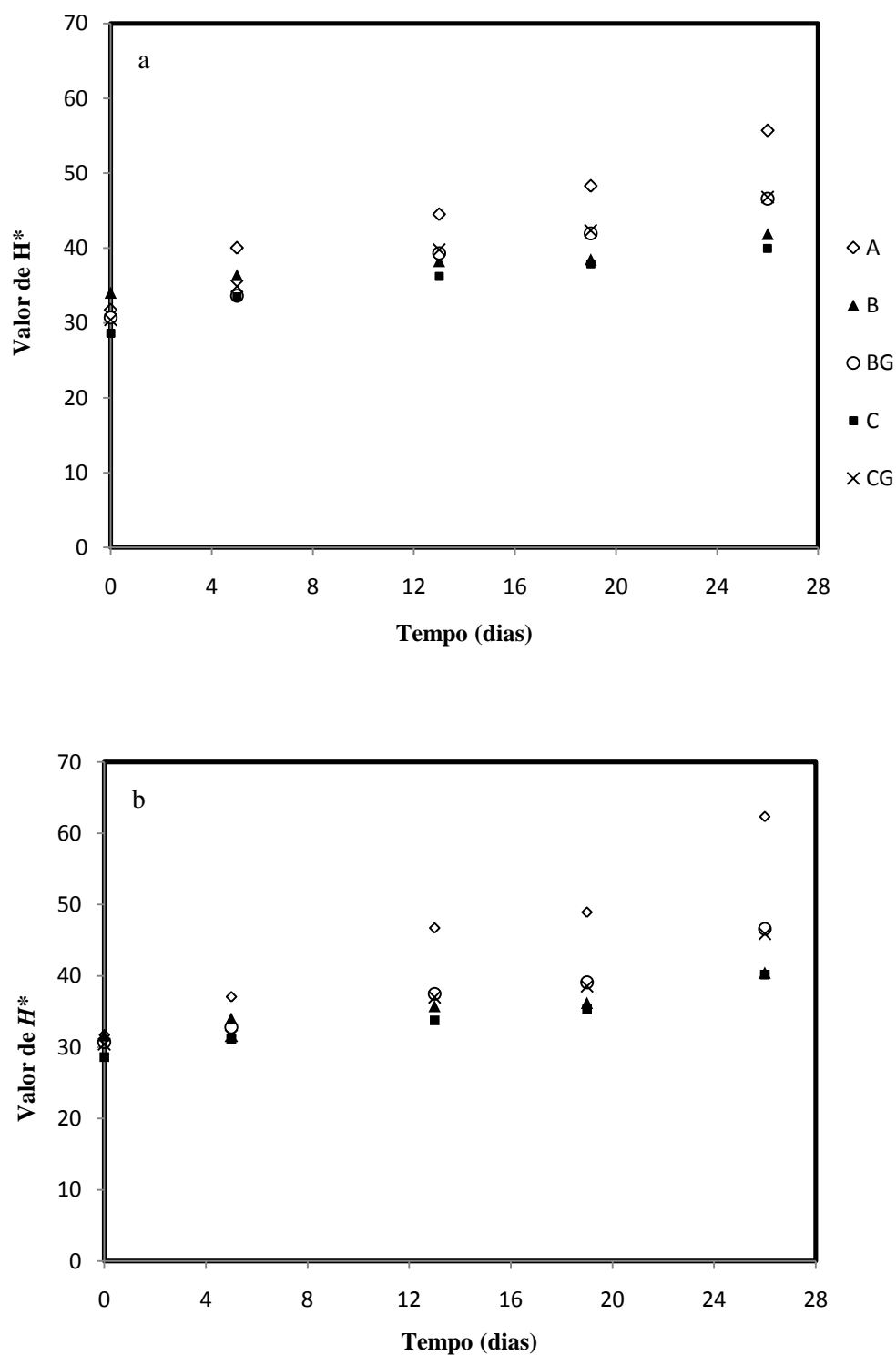


Figura 40. Mudanças ocorridas no ângulo de tonalidade (H^*) em função do tempo, para as cápsulas preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG), armazenadas no escuro (a) e expostas à luz UV (b), a temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

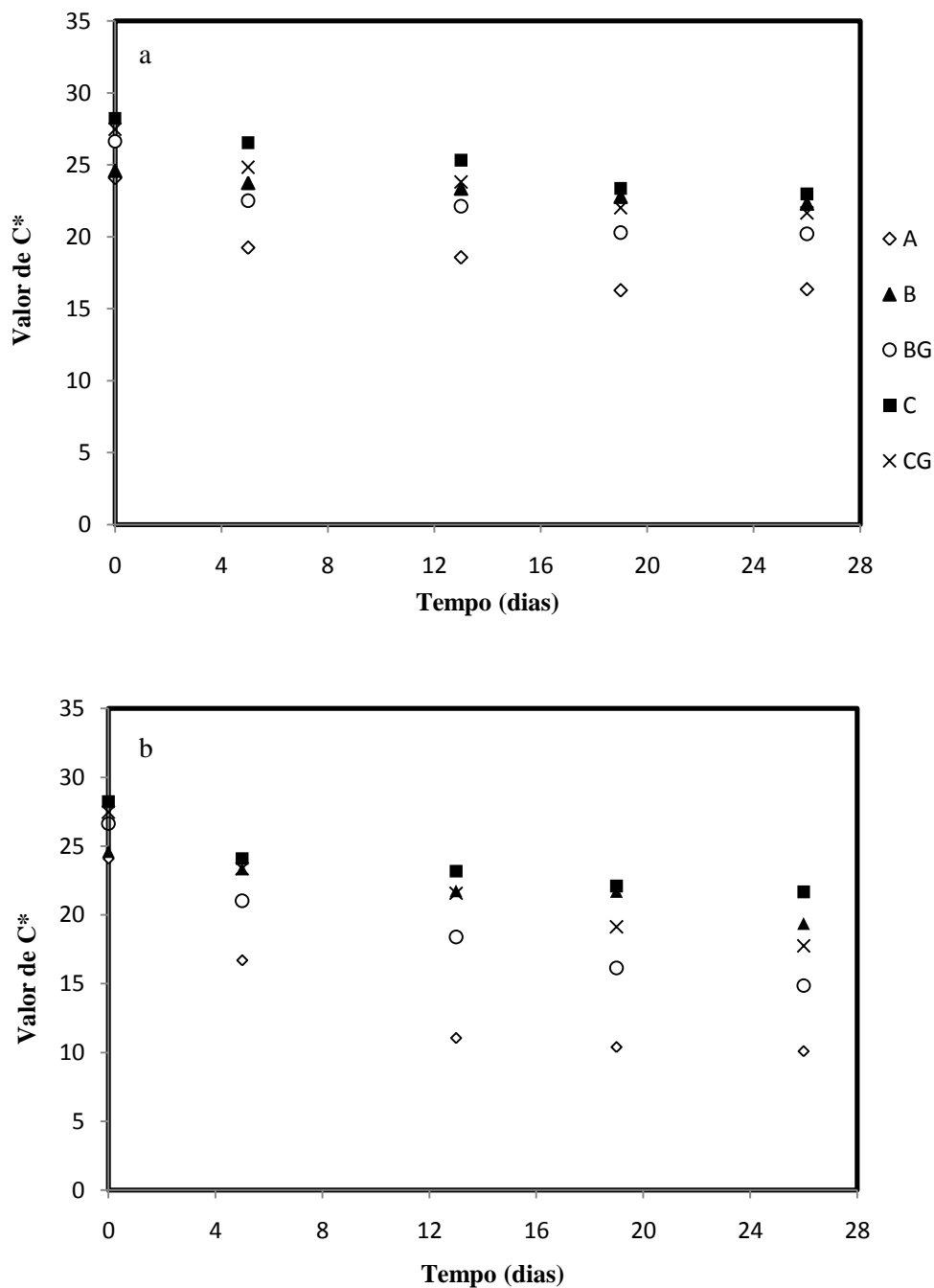


Figura 41. Mudanças ocorridas no Chroma (C) em função do tempo, para as cápsulas preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG), armazenadas no escuro (a) e expostas à luz UV (b), a temperatura ambiente.

A Figura 42 apresenta as mudanças ocorridas no ΔE^* , em função do tempo, das cápsulas colocadas no escuro e expostas à luz UV. Os valores de ΔE^* aumentaram consideravelmente com o tempo, ou seja, as amostras não apresentaram a mesma coloração inicial. Cabe ressaltar que quanto maior o valor de ΔE^* , maior a diferença total de cor da amostra analisada em relação à amostra inicial. As cápsulas contendo

amido hidrolisado diferiram pouco nas condições testadas, ao contrário das amostras preparadas com amido nativo que apresentaram maiores diferenças de cor, especialmente, quando expostas à luz UV.

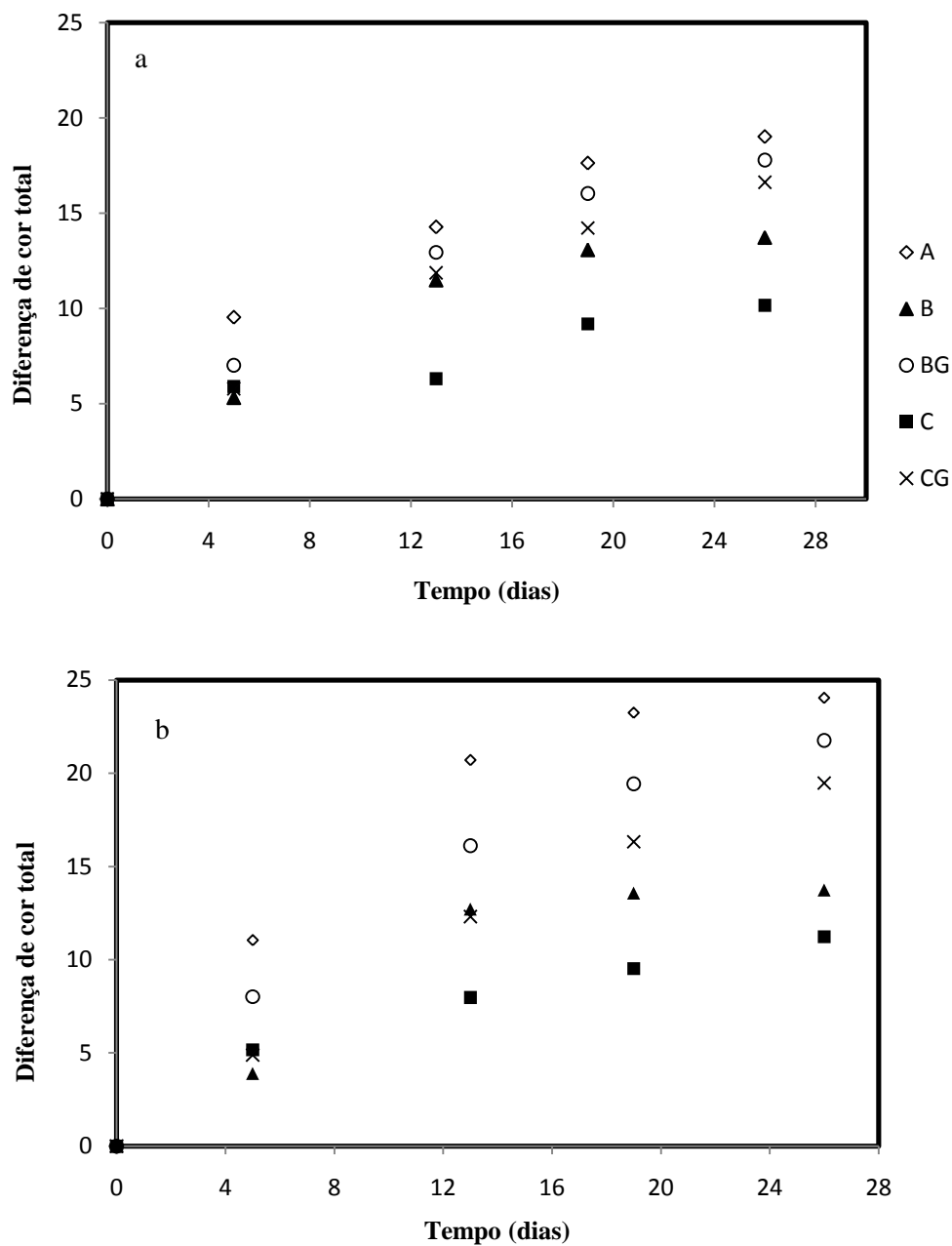


Figura 42. Mudanças ocorridas na diferença de cor total (ΔE^*) em função do tempo, para as cápsulas preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG), armazenadas no escuro (a) e expostas à luz UV (b), a temperatura ambiente.

Os dados experimentais obtidos para os parâmetros de cor (L^* e a^*), diferença de cor total (ΔE^*), tonalidade (H^*) e Chroma (C^*) foram ajustados utilizando diferentes modelos cinéticos. A análise de regressão foi aplicada às equações cinéticas de ordem zero e de primeira ordem. As Tabelas 24 a 27 mostram os parâmetros cinéticos obtidos nestes ajustes, para as amostras expostas à luz UV, armazenadas no escuro e estocadas a 10°C e 30°C, respectivamente. Os resultados revelaram que os modelos cinéticos de ordem zero e de primeira ordem apresentaram coeficientes de determinação similares (R^2), em relação aos parâmetros L^* , a^* , H^* e C^* . Quando isso acontece opta-se pelo modelo mais simples, neste caso, pelo modelo de ordem zero. Por outro lado, os dados referentes à diferença de cor total (ΔE^*) ajustaram-se melhor ao modelo cinético de ordem zero. Lopes *et al.* (2005) também adaptaram modelos cinéticos ao estudar parâmetros de cor ligados à estabilidade de carotenóides da polpa de pitanga congelada. O parâmetro a^* foi ajustado a um modelo de primeira ordem e o (ΔE^*) a um modelo de ordem zero. Valores experimentais de a^* também foram ajustados a um modelo cinético de ordem zero por Sutter *et al.* (2007) ao estudarem as mudanças ocorridas na matiz do β -caroteno encapsulado com manitol.

O parâmetro cinético k , que corresponde à velocidade de reação (formação ou degradação), foi maior para as amostras contendo amido nativo em todas as condições testadas e para todos os parâmetros analisados (L^* , a^* , H^* , C^* e ΔE^*). Logo, pode-se concluir que o β -caroteno encapsulado em matrizes de amido nativo apresentou maior suscetibilidade às condições testadas. Esses resultados são similares aos apresentados nos outros testes de estabilidade, que confirmam o baixo potencial encapsulante deste material.

Tabela 24. Resultados da regressão linear dos parâmetros de cor (L^* e a^*), diferença de cor total (ΔE^*), ângulo de tonalidade (H^*) e Chroma (C^*) utilizando modelos cinéticos de ordem zero e primeira ordem para as cápsulas expostas à luz UV preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG).

Amostra	Parâmetros	Modelo de ordem zero			Modelo de primeira ordem		
		k_0	C_0	R^2	k_1	C_0	R^2
A	L^*	0,687	76,023	0,85	0,008	76,461	0,83
	a^*	-0,571	17,764	0,87	-0,064	19,736	0,973
	ΔE^*	0,904	4,420	0,851	0,046	8,190	0,705
	H^*	1,111	31,370	0,968	0,024	32,395	0,975
	C^*	-0,508	20,878	0,778	-0,041	22,433	0,884
B	L^*	0,516	70,416	0,827	0,006	70,688	0,810
	a^*	-0,287	21,564	0,991	-0,016	21,707	0,983
	ΔE^*	0,564	1,684	0,847	0,051	4,280	0,687
	H^*	0,413	28,606	0,970	0,012	28,772	0,977
	C^*	-0,183	24,461	0,948	-0,008	24,516	0,946
BG	L^*	0,684	71,735	0,920	0,008	72,128	0,901
	a^*	-0,457	21,348	0,943	-0,031	22,042	0,975
	ΔE^*	0,827	2,624	0,929	0,053	6,087	0,794
	H^*	0,580	30,024	0,957	0,016	30,303	0,972
	C^*	-0,420	24,76	0,903	-0,023	25,333	0,941
C	L^*	0,336	72,423	0,976	0,004	72,463	0,974
	a^*	-0,246	22,518	0,936	-0,013	22,693	0,953
	ΔE^*	0,401	1,725	0,918	0,051	3,26	0,790
	H^*	0,297	31,893	0,930	0,008	31,970	0,936
	C^*	-0,223	26,671	0,792	-0,010	26,832	0,815
CG	L^*	0,648	69,827	0,964	0,008	70,124	0,954
	a^*	-0,415	22,869	0,979	-0,024	23,285	0,989
	ΔE^*	0,762	0,994	0,978	0,062	4,273	0,859
	H^*	0,579	29,396	0,954	0,016	29,657	0,969
	C^*	-0,354	26,325	0,942	-0,016	26,628	0,960

k_0 , velocidade de reação de ordem zero; k_1 , velocidade de reação de primeira ordem; C_0 , constante.

Tabela 25. Resultados referentes aos parâmetros de cor (L^* e a^*), diferença de cor total (ΔE^*), ângulo de tonalidade (H^*) e Chroma (C^*) utilizando modelos cinéticos de ordem zero e primeira ordem, para as amostra armazenadas no escuro à temperatura ambiente preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG).

Amostra	Parâmetros	Modelo de ordem zero			Modelo de primeira ordem		
		k_0	C_0	R^2	k_1	C_0	R^2
A	L^*	0,576	75,326	0,885	0,008	75,617	0,868
	a^*	-0,380	18,352	0,847	-0,030	18,992	0,888
	ΔE^*	0,688	3,423	0,876	0,047	6,128	0,747
	H^*	0,844	33,410	0,968	0,019	34,170	0,960
	C^*	-0,272	22,348	0,800	-0,015	22,637	0,832
B	L^*	0,499	70,659	0,875	0,007	70,651	0,866
	a^*	-0,221	22,665	0,928	-0,011	22,798	0,941
	ΔE^*	0,530	2,041	0,882	0,049	4,310	0,733
	H^*	0,413	28,606	0,970	0,012	28,879	0,978
	C^*	-0,206	27,880	0,958	-0,008	27,926	0,962
BG	L^*	0,588	71,676	0,922	0,008	71,705	0,910
	a^*	-0,323	21,628	0,921	-0,018	21,741	0,954
	ΔE^*	0,670	2,319	0,926	0,052	5,068	0,793
	H^*	0,608	30,776	0,996	0,016	31,207	0,991
	C^*	-0,222	25,156	0,793	-0,010	25,318	0,814
C	L^*	0,318	73,371	0,937	0,004	73,450	0,931
	a^*	-0,149	20,861	0,866	-0,008	20,864	0,882
	ΔE^*	0,349	1,912	0,845	0,042	3,161	0,744
	H^*	0,269	34,438	0,941	0,007	34,512	0,941
	C^*	-0,082	24,407	0,966	-0,004	24,415	0,970
CG	L^*	0,544	70,759	0,937	0,007	71,001	0,924
	a^*	-0,313	22,479	0,921	-0,017	22,739	0,941
	ΔE^*	0,627	1,790	0,944	0,054	4,384	0,816
	H^*	0,608	31,185	0,989	0,015	31,651	0,978
	C^*	-0,215	26,673	0,915	-0,009	26,789	0,928

k_0 , velocidade de reação de ordem zero; k_1 , velocidade de reação de primeira ordem; C_0 , constante.

Tabela 26. Resultados referentes aos parâmetros de cor (L^* e a^*), diferença de cor total (ΔE^*), ângulo de tonalidade (H^*) e Chroma (C^*) utilizando modelos cinéticos de ordem zero e primeira ordem, para as amostra armazenadas a 10°C preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG).

Amostra	Parâmetros	Modelo de ordem zero			Modelo de primeira ordem		
		k_0	C_0	R^2	k_1	C_0	R^2
A	L^*	0,537	74,133	0,935	0,006	74,353	0,924
	a^*	-0,281	18,500	0,783	-0,020	18,907	0,827
	ΔE^*	0,601	2,326	0,904	0,051	4,749	0,775
	H^*	0,549	35,102	0,808	0,013	35,606	0,782
	C^*	-0,201	22,590	0,769	-0,010	22,756	0,796
B	L^*	0,418	70,573	0,861	0,005	70,742	0,850
	a^*	-0,210	22,651	0,916	-0,011	22,790	0,935
	ΔE^*	0,492	0,791	0,946	0,058	2,964	0,811
	H^*	0,421	28,855	0,975	0,012	29,097	0,968
	C^*	-0,188	27,206	0,850	-0,008	27,305	0,866
BG	L^*	0,473	70,065	0,935	0,006	70,246	0,924
	a^*	-0,208	22,424	0,828	-0,011	22,584	0,853
	ΔE^*	0,508	1,352	0,928	0,054	3,558	0,785
	H^*	0,439	30,506	0,99	0,012	30,723	0,989
	C^*	-0,172	25,946	0,920	-0,007	26,023	0,932
C	L^*	0,457	69,597	0,938	0,006	69,635	0,931
	a^*	-0,116	21,632	0,969	-0,006	21,632	0,969
	ΔE^*	0,351	1,410	0,884	0,049	2,881	0,741
	H^*	0,217	33,568	0,81	0,006	33,670	0,793
	C^*	-0,040	24,872	0,920	-0,001	24,873	0,939
CG	L^*	0,464	70,881	0,946	0,006	71,053	0,935
	a^*	-0,206	21,665	0,801	-0,011	21,786	0,811
	ΔE^*	0,499	1,749	0,933	0,053	3,710	0,815
	H^*	0,352	32,654	0,817	0,009	32,914	0,793
	C^*	-0,146	26,635	0,833	-0,006	26,694	0,854

k_0 , velocidade de reação de ordem zero; k_1 , velocidade de reação de primeira ordem; C_0 , constante.

Tabela 27. Resultados referentes aos parâmetros de cor (L^* e a^*), diferença de cor total (ΔE^*), ângulo de tonalidade (H^*) e Chroma (C^*) utilizando modelos cinéticos de ordem zero e primeira ordem, para as amostra armazenadas a 30°C preparadas a partir de amido nativo (A), amido hidrolisado DE 6 sem (B) e com gelatina (BG) e amido hidrolisado DE 12 sem (C) e com gelatina (CG).

Amostra	Parâmetros	Modelo de ordem zero			Modelo de primeira ordem		
		k_0	C_0	R^2	k_1	C_0	R^2
A	L^*	0,697	75,249	0,910	0,008	75,641	0,892
	a^*	-0,545	18,583	0,927	-0,050	19,735	0,960
	ΔE^*	0,885	3,146	0,923	0,053	6,646	0,802
	H^*	1,266	31,945	0,958	0,026	33,164	0,969
	C^*	-0,399	22,074	0,876	-0,024	22,657	0,915
B	L^*	0,410	72,252	0,99	0,005	72,352	0,987
	a^*	-0,271	22,283	0,896	-0,015	22,468	0,906
	ΔE^*	0,615	1,584	0,951	0,056	4,143	0,823
	H^*	0,380	33,841	0,900	0,010	33,910	0,906
	C^*	-0,218	26,689	0,790	-0,009	26,839	0,811
BG	L^*	0,670	71,543	0,940	0,008	71,900	0,924
	a^*	-0,433	21,881	0,972	-0,027	22,393	0,988
	ΔE^*	0,794	2,066	0,953	0,056	5,360	0,826
	H^*	0,735	30,570	0,983	0,018	31,165	0,978
	C^*	-0,338	25,492	0,939	-0,016	25,768	0,955
C	L^*	0,560	70,263	0,942	0,007	70,520	0,929
	a^*	-0,229	21,128	0,966	-0,013	21,247	0,970
	ΔE^*	0,460	1,424	0,947	0,057	3,104	0,862
	H^*	0,563	29,750	0,945	0,015	30,178	0,933
	C^*	-0,120	24,327	0,946	-0,005	24,353	0,947
CG	L^*	0,634	70,386	0,974	0,008	70,670	0,964
	a^*	-0,421	22,902	0,971	-0,024	23,275	0,971
	ΔE^*	0,759	1,250	0,982	0,061	4,352	0,878
	H^*	0,714	30,635	0,991	0,018	31,157	0,992
	C^*	-0,334	27,116	0,986	-0,014	27,297	0,986

k_0 , velocidade de reação de ordem zero; k_1 , velocidade de reação de primeira ordem; C_0 , constante.

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem escrever as conclusões listadas a seguir.

- Os testes preliminares de hidrólise mostraram que o tipo de ácido (HCl ou H₂SO₄) utilizado não afetou significativamente os resultados de dextrose equivalente (DE) encontrados. O tempo de hidrólise foi um parâmetro significativo, visto que até 6 horas de reação obteve-se uma porcentagem de hidrólise muito baixa.
- A partir do planejamento experimental, verificou-se que os valores de dextrose equivalente são maiores em temperaturas e concentrações mais elevadas, porém em faixas de temperaturas mais baixas, a concentração de ácido não influencia significativamente no valor de DE.
- Houve formação de micropartículas para todos os sistemas estudados nesse projeto, porém o amido nativo não foi considerado um bom agente encapsulante devido aos valores de eficiência e conteúdo superficial, assim como os resultados apresentados nos testes de estabilidade.
- A formulação contendo amido DE 12, apresentou a maior retenção de β -caroteno, e menor conteúdo superficial, indicando que houve a formação de um filme estável na superfície da cápsula, o que resultou em menor perda de β -caroteno durante os testes de estabilidade.
- A utilização de gelatina resultou em encapsulados com menor conteúdo superficial de β -caroteno, porém nos testes de estabilidade os resultados foram inferiores aos

encontrados para as amostras sem gelatina, esses resultados podem ser explicados pela estrutura apresentada pelas partículas.

- As micropartículas liofilizadas preparadas com amido se apresentaram aproximadamente esféricas, com parede lisas e homogêneas, sem poros e com algumas protuberâncias. A utilização de gelatina resultou em diferenças morfológicas, visto que as partículas apresentaram formas mais indefinidas e superfícies rugosas.

- O tamanho médio volumétrico de todas as microcápsulas variou de 20 a 30 μm , ou seja, ocorreram poucas diferenças entre as amostras quanto a este parâmetro. O tamanho médio das microcápsulas liofilizadas foi maior para os encapsulados onde a formulação apresentava amido nativo e gelatina.

- As temperaturas de transição vítrea das cápsulas preparadas com amido nativo e hidrolisado foram muito próximas, apenas a formulação contendo amido nativo e gelatina apresentou a maior T_g (90 °C).

- Os perfis das isotermas a 10, 20 e 30° C das cápsulas feitas com amido 12 DE foram predominantemente do tipo sigmóide, característico das curvas do Tipo II, e o modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais na faixa de temperatura estudada foi o de Peleg. Além disso, verificou-se que nem sempre as isotermas em diferentes temperaturas apresentam separação consistente ao longo de toda a curva.

- O conteúdo de umidade de monocamada (X_m), que é um importante parâmetro para prever as condições de armazenamento e a deterioração de alimentos, obtido pelos modelos de GAB e BET, possui valores muito próximos na faixa de temperatura estudada, sendo que os mesmos mostraram um pequeno acréscimo no teor de umidade de monocamada, com o aumento da temperatura.

- A degradação do β -caroteno encapsulado nas diferentes matrizes seguiu cinética de primeira ordem, além disso os dados referentes à degradação utilizando amido DE 12 se ajustaram adequadamente ao modelo de Weibull.

- O processo de encapsulação foi efetivo já que o β -caroteno livre apresentou uma velocidade de reação entre 4 e 6 vezes mais rápida que nos pós encapsulados com amido DE 12.

-
- Ocorreram consideráveis diferenças na degradação do β -caroteno quando o mesmo foi exposto a 10° e a 30° C. Logo, conclui-se que a temperatura influenciou consideravelmente a estabilidade do pigmento, conforme esperado. A luz UV também correspondeu a um fator muito importante na conservação do pigmento, visto que foram obtidos os menores tempos de meia-vida quando as cápsulas foram expostas a este fator.
 - A análise colorimétrica mostrou ser uma boa análise para avaliar qualitativamente as mudanças de cor ocorridas no pigmento encapsulado, visto que os parâmetros L^* e a^* sofreram alterações consideráveis com o tempo.
 - Os experimentos executados neste trabalho provaram que o processo de hidrólise aumentou, consideravelmente, o potencial do amido de pinhão como agente encapsulante.

Sugestões para Trabalhos Futuros

- Estudar maneiras de otimizar o descascamento do pinhão, visto que para obter o amido é necessário retirar a casca e a película interna da semente do pinhão que são feitas manualmente.
- Avaliar outras técnicas encapsulantes como a atomização, visto que o amido hidrolisado produz, aparentemente, suspensões com baixa viscosidade.
- Testar modificações no amido hidrolisado incluindo ligações de grupamentos lipófilos, para aumentar sua afinidade com compostos apolares, visto que o amido hidrolisado possui baixa capacidade emulsificante.
- Avaliar a inclusão de monossacarídeos à matriz encapsulante e verificar a estabilidade conferida ao núcleo.
- Testar novas técnicas de modificação no amido de pinhão como a esterificação, fosforilação e a oxidação e verificar o potencial desses materiais como agentes encapsulantes.
- Avaliar a estabilidade de outros compostos ativos utilizando o amido hidrolisado de pinhão como material de parede.
- Avaliar a combinação desses materiais com outros agentes importantes como a goma arábica, maltodextrinas comerciais entre outros, a fim de melhorar propriedades como a solubilidade em água fria e ampliar o seu campo de uso.
- Avaliar a estabilidade das micropartículas frente a outros fatores como a umidade relativa.

- Estudar possibilidades de incorporação das micropartículas liofilizadas em sistemas alimentícios.
- Verificar a estabilidade do composto encapsulado após a incorporação no sistema alimentício.

Referências Bibliográficas

AGGARWAL, B. B. & SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*, v.71, n.10, p.1397-1421. 2006.

AGUILERA, J.M. Temas en Tecnologia de Alimentos. México: Instituto Politécnico Nacional. 337 p. 1997.

AL-MUHTASEB, A.H., MCMINN, W.A.M. & MAGEE, T.R.A. Water sorption isotherms of starches derivatives as affected by freeze storage and thawung. *Food Technology*, v.14, n.1, p.135-142

ALTAY, F. & GUNASEKARAN, S. Influence of drying, water content, and heating rate on gelatinization of corn starches. *Journal of Agricultural an Food Chemistry*, v.54, p. 4235-4245. 2006.

ALVES, C. C. O., RESENDE, J. V., CRUVINEL, R. S. R & PRADO, M. E. T. Estabilidade da microestrutura e do teor de carotenóides de pós obtidos da polpa de pequi (*Caryocar brasiliensi Camb.*) liofilizada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.28, n.4, 2008.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*, v.350, n.1, p.103-108. 1996.

ANSELMINI, J. I. Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia*, na região de Curitiba -PR. (Dissertação de Mestrado). UFPR, Curitiba, 2005. 91 p.

AOAC. Official methods of Analysis 18 th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. 2005

ARSLAN, N. & TOGRUL, H. The fitting of various models to water sorption isotherms of tea stored in a chamber under controlled temperature and humidity. *Journal of Stored Products Research*, v.42, p.112-135, 2006.

ASCHERI, D. P. R., MARQUEZ, M. O. M. & MARTUCCI, E. T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja: seleção de material de parede. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, p.1-6. 2003.

ATWELL, W. A. H., LINEBACK, L.F., VANIANSMARSTON, D.R. & ZOBBER, H.F. The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. *Cereal Food World*, v.33, p.306-311. 1998.

AVGOUSTAKIS, K., BELETSI, A., PANAGI, Z., KLEPETSANIS, P., KARYDAS, A.G. & ITHAKISSIOS, D.S. PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *Journal of Controlled Release*, v. 79, n.1-3, p.123-135, 2002.

AVIARA, N. A., AJIBOLA, O. O., & ONI, S. A. Sorption equilibrium and thermodynamic characteristics of soy bean. *Biosystems Engineering*, v.87, n.2, p.179–190, 2004.

AZARNIA, S., ROBERT, N. & LEE, B. Biotechnological methods to accelerate cheddar cheese ripening. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 26, n. 3, p. 121-143, 2006.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos. *Brazilian Journal of Food and Nutrition*, v.16, n.1, p.89-97. 2005.

BARROS, R.B. Obtenção de amido e seus derivados. *Refinações de milho Brasil Ltda.* 35 p., 1984.

BELLO-PÉREZ, L. A.; GARCIA SUAREZ, F.J.; MENDEZ-MONTEALVO, G.; NASCIMENTO J. R. O.; LAJOLO, F.M.;CORDENUNSI, B.R. Isolation and Characterization of starch from seeds of *Araucária brasiliensis*: A novel starch for application in food industry. *Starch/Stärke*, v. 58, n.6, p. 283-291, 2006.

BEMILLER, J. N. Starch Modification: Challenges and Prospects. *Starch - Stärke*, v.49, p.127-131. 1997.

BEN-AMOTZ, A. & LEVY, Y. Bioavailability of a natural mixture compared with synthetic all-trans β -carotene in human serum. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.63, p.729-734. 1996.

BENINCA, C. Emprego de técnicas termoanalíticas na análise de amidos nativos e quimicamente modificados de diferentes fontes botânicas. Ponta Grossa, 2008. 76 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa.

BERTOFT, E. Composition of clusters and their arrangement in potato amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, v.68, n.3, p.433-446. 2007.

BERTOLINI, A. C., SIANI, A. C. & GROSSO, C. R. F. Stability of monoterpenes of encapsulated in gum arabic by spray-drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.780-785. 2001.

BARBOSA, M. I. M. J., BORSARELLI, C. D., & MERCADANTE, A. Z. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Research International*, v.8, p.989–994, 2005.

BHANDARI, B., D'ARCY, B. & YOUNG, G. Flavour retention during high temperature short time extrusion cooking process: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 36, n. 5, p. 453-461, 2001.

- BIANCHI, M. L. P. & ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, v.12, n.2, p.123-130. 1999.
- BILLIADERIS, C. G., PAGE, C. M., MAURICE, T. J., & VOSE, J.R. Starch gelatinization phenomenon studied by differential scanning calorimetry. *Journal of Food Science*, v.45, p.1669-1674. 1980.
- BLANSHARD, J.M.V., FRAZIER, P. J. & GALLIARD, T. Chemistry and physics of baking. *The Royal Society of Chemistry*, 276, 1987.
- BLAHOVEC, J. Sorption isotherms in materials of biological origin mathematical and physical approach. *Journal of Food Engineering*, v.65, p. 489-495, 2004.
- BOBBIO, F. O. & BOBBIO, P.A. *Introdução à Química de Alimentos*. 3 ed. São Paulo: Livraria Varela. 238 p.2003.
- BOILEAU, A. C., MERCHEN, N. R., WASSON, K., ATKINSON, C. A. & ERDMAN, J. W. J. Cis-lycopene is more bioavailable than trans-lycopene in vitro and in vivo in llymph-cannulated ferrets. *The Journal of Nutrition*, v.129, p.1176-1181. 1999.
- BOSS, E. A., FILHO, R. M. & TOLEDO, E. C. V. Freeze drying process: real time model and optimization. *Chemical Engineering and Processing*, v.43, p.1475–1485. 2004.
- BOSCOVIC, M.A. fate of lycopene in dehydrated tomato products: carotenoid isomerization in food system. *Journal Food Science and Technology*, v.44, n.1, p.84-86, 1979
- BRASIL. Portaria n°. 06-N, de 15 de janeiro de 1992. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. Diário Oficial da república federativa do Brasil, Brasília, 23 jan. 1992.
- BRUNAUER, S., EMMET, P.H. & TELLER, E. Desorption of gases in multimolecular layer. *Journal of American Chemists Society*, 60, 309-319. 1938.
- BRUSCHI, M. L., CARDOSO, M.L.C., LUCCHESI, M.B & GREMIÃO, M.P.D. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray drying technique preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, v.26, n.4, p.45-55. 2003.
- BULÉON, A. C., P., PLANCHOT, V., BALLS, S. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Biomacromolecules*, v.23, p.85-112. 1998.
- CAI, Y. & CORKE, H. Production and properties of spray-dried Amaranthus Betacyanin Pigments. *Journal of Food Science*, v.65, n.6, p.1248-1252. 2000.
- CAPELLA, A.C.V., PENTEADO, P.T.P.S & BALBI, M.E. Semente de *Araucaria angustifolia*: aspectos morfológicos e composição química da farinha. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v.27, n.1, p.135-142.2009.

CARDELLO, H. M. A. B. & CELESTINO, E. M. Encapsulação de aromas e sabores: utilização de amidos como agentes encapsulantes. *Boletim SBCTA*, v.30, n.2, p.166-171. 1996.

CARDOSO, F. S. N. Produção de microencapsulados de amido com espessura controlada em leite fluidizado. Campinas, 2000. 69 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

CARDOSO, F. S. N., GROSSO, C. R. F. & VITALI, A. Starch Microcapsules Obtained by Spray Drying and Coated using Fluidized Bed. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 4, n. 69, p. 131-136, 2001

CARVALHO, P.E.R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e usos da madeira. Colombo: EMBRAPA-CNPQ/Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994.

CARVALHO, C. R. L., CARVALHO, P. R. N., CAROL H., & COLLINS, C. H. High-performance liquid chromatographic determination of the geometrical isomers of fl-carotene in several foodstuffs. *Journal of Chromatography A*, v.697, p.289-294. 1995.

CASTILLO, M.D., MARTÍNEZ, E. J., GONZÁLEZ, H.H.L., PACIN, A.M. & RESNIK, S.L. Study of mathematical models applied to sorption isotherms of Argentinean black bean varieties. *Journal of Food Engineering*, 60, 343-348. 2003.

CENTRO DE INTELIGÊNCIA EM FLORESTAS (CIFLORESTAS). Pinheiro-do-Paraná 2010. Disponível em http://www.ciflorestas.com.br/texto.php?p=pinheiro_parana. Acesso em 30/03/2010.

CEREDA, M. P. Amidos modificados. *Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.30, n.1, p.31-36. 1996.

CEREDA, M. P. F., DAIUTO, E.R., DEMIATE, I.M., CARVALHO, L.J.C.B., LEONEL, M. & VILPOUX, O.F. Sarmiento, S.B.S. Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas-Propriedades gerais do amido. São Paulo: Fundação Cargill, v.1. 2001. 221 p.

CHANG, Y. I., SCIRE, J. & JACOBS, B. Effect of particle size and microstructure properties on encapsulated orange oil, in flavor encapsulation. Reineccius G. A.; Risch, S. J. eds. ACS Symposium, 1988

CHANG, Y. H., LIN, J.H. & PAN, C. L. Type and concentration of acid nos olubility and molecular size of acid-methanol-treated rice starches differing in amylose content. *Carbohydrate Polymers*, v. 79, p. 762-768, 2010

CHATTOPADHYAYA, S., SINGHAL, R. S. & KULKARNI, P. R. Oxidised starch as gum arabic substitute for encapsulation of flavours. *Carbohydrate Polymers*, v.37, p.143-144. 1998.

CHEETHAM, N. W. H. & TAO, L. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. *Carbohydrate Polymers*, v.36, n.4, p.277-284. 1998.

CHEN, K. N., CHEN, M. J. & LIN, C. W. Optimal combination of the encapsulating materials for probiotic microcapsules and its experimental verification (R1). *Journal of Food Engineering*, v. 76, n. 3, p. 313-320, 2006.

CHEN, G. & WANG, W. Role of Freeze Drying in Nanotechnology. *Drying Technology*, v.25, p.29-35. 2007.

CHEN, J., SHI, J., XUE, S. J. & MA, Y. Comparison of lycopene stability in water- and oil-based food model systems under thermal- and light-irradiation treatments. *LWT - Food Science and Technology*, v.42, p.740-747. 2009.

CHOI, S. & REGENSTEIN, J. M.; Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. *Journal of Food Science*, v. 65, p. 194-199, 2000.

CHOP, H. & BREENE, W. Oxidative decolorization of β -carotene in low- moisture model systems. *Journal of Food Science*. p.37- 66, 1972.

CHUMPITAZ, L. D. A. Microencapsulação de óleo essencial de laranja por atomização. Campinas, 1995. 78 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

CHUNG, D.S & PFOST, H.B. Adsorption and desorption of water vapor by cereal grains and their products. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, v.10, p.549-551.1967.

CHUNG, D.S. & PFOST, H.B. Part I: Heat and free energy changes of adsorption and desorption. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 549-555, 1976.

CLADERA-OLIVEIRA, F. Estudos tecnológicos e de engenharia para o armazenamento e processamento do pinhão. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008. 197 p.

CLADERA-OLIVERA, F, PETTERMAN, A.C., NOREÑA, C.P.Z, WADA, K. & MARCZAK, L.D.F. Thermodynamics properties of moisture desorption of raw pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds). *International Journal of Food science & Technology*, v.43, n.5, p.900-907, 2008.

CONSTANT, P. B. L. Stringheta, P.C. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Boletim SBCTA*, v.36, n.1, p.12-18. 2002.

CORDENUNSI, B. R., WENZEL DE MENEZES, E., GENOVESE, M. I., COLLI, C., GONCALVES DE SOUZA, A. & LAJOLO, F. M. Chemical Composition and Glycemic Index of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, n.11, p.3412-3416. 2004.

- CORRADINI, M.G. & PELEG, M. A model of non-isothermal degradation of nutrients, pigments and enzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.84, n.3, p.217–226, 2004.
- COULTATE, T. P. Alimentos- A Química de seus Componentes. Porto alegre: Artmed. 2004
- CRUZ-OREA, A., PITSI, G., JAMÉE, P. & THOEN, J. Phase transitions in the starch-water system studied by adiabatic scanning calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n.50, p. 1335-1344, 2002.
- DEPYPERE, F. E. A. Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. *Appl. Biotechnol. Food Sci. Pol.*, v.1, n.2, p.75-94, 2003.
- DESAI, K. G. H. & PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, v.23, n.7, p.1361-1394. 2005.
- DESOBRY, S. A., NETTO, F. M. & LABUZA, T. P. Comparison of Spray-drying, Drum-drying and Freeze-drying for β -Carotene Encapsulation and Preservation. *Journal of Food Science*, v.62, n.6, p.1158-1162, 1997.
- DESOBRY, S. A., NETTO, F. M. & LABUZA, T. P. Influence of maltodextrin systems at an equivalent 25DE on encapsulated β -carotene loss during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, v.23, n.1, p.39-55, 1999.
- DI MASCIO, P. M., M.C. & SIES, H. Antioxidante defense systems, the role of carotenoid, tocopherol and thiols. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.53, p.194-200. 1991.
- DIB TAXI, C. M. A. Suco de camu-camu (*Myrciaria dubia*) microencapsulado obtido através do processo de secagem por atomização. Campinas, 2001. 162 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP
- DONOVAN, J.W. & BERKELEY, J.M. Multiple phase transitions of starches and Nägeli amyloextrins. *Starch/Stärke*, v. 32, n.6, p.190-194, 1980.
- EDGE, D. J. & MCGARVE, T. G. The carotenoids as anti-oxidants - a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.41, n.3, p.189-200. 1997.
- EFSTRAND, L., FRIGARD, T., ANDERSSON, R., ELIASSON, ANN-CHARLOTTE., JONSSON, M., RESLOW, M., & WAHLGREN, M. Recrystallisation behaviour of native and processed waxy maize starch in relation to the molecular characteristics. *Carbohydrate Polymers*, n.57, p.389-400, 2004.
- ELLIS, R.P., COCHRANE, M.P., DALE, M.F.B., DUFFUS, C.M., LYNN, A., MORRISON, I. M., PRENTICE, R.D.M., SWANSTON, J.S. & TYLLER, S.A. Starch production and industrial use. *Journal Science of Food Agricultural*, n.77, p.289-311, 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Cultivo do pinheiro-do-paraná. 2001. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pinheiro-do-paraná>.

ERSUS & YURDAGEL. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota L.*) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, v.80, p. 805–812, 2007.

FANG, Z. & BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. In Press, Accepted Manuscript, 2010.

FAVARO-TRINDAE, C.S., PINHO, S.C.D. & ROCHA, G.A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.11, n.2, p. 103-112, 2008.

FELLOWS, P. J. Tecnologia do processamento de alimentos: Princípios e Prática. Porto Alegre: Artmed. 2006

FENNEMA, O. Química de los Alimentos. Espanha: Editorial Acribia. 1258 p.2000

FERRERO, C., MARTIN, M.N., & ZANTZKY, N. E. Corn-starch-xanthan gum interaction and its effect on the stability during storage of frozen gelatinized suspensions. *Starch - Stärke*, v.46, p.300-306. 1994.

FERREIRA, J.E.M. Cinética e fatores que influenciam na degradação de carotenóides em sistemas modelos e alimentos, 2001. 96 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

FONTANA, J.D.; MENDES, S.V.; PERSIKE,D.S.; PERACETA,L.; PASSOS,M. Carotenóides Cores Atraentes e Ação biológica. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.13, p.40-45, 2000.

FRENCH, D. Chemical and physical properties of starch. *Journal of Animal Science*, v 37, p. 1048-1061, 1973.

FRENCH, D. Organization of starch granules. In: Whistler, R.L., Bemiller, J.N., Paschall, E. F. *Starch:Chemistry and technology*. 2 ed. San Diego: Academy Press, Cap. 7, p.183-247, 1984

GALLANT, D. J., BOUCHET, B., BULÉON, A. & PÉREZ, S. Physical characteristics of starch granules and suscetibility to enzymatic degradation. *European Journal of clinical Nutrition*, v.46, p.3-16, 1992.

GALLANT, D.J., BOUCHET, B. & BADWIN, P.M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers*, v.32, p.177-191, 1997.

GARCIA, V., COLONNA, P., BOUCHET, B. & GALLANT, D.J. Structural changes of cassava starch granule after heating at intermediate water contents. *Starch-Starke*, v.49, n.5, p.171-179, 1997

GARCIA-ALONSO, A., JIMÉNEZ-ESCRIG, A., MARTÍN-CARRÓN, N., BRAVO, L. & SAURA-CALIXTO, F. Assesment of some parameters involved in the gelatinization and retrogradation of starch. *Food Chemistry*, n.66, p.181-187. 1999.

GAZIANO, J. M., JOHNSON, E. J., RUSSEL, R. M., MANSON, J. E., STAMPFER, M. J., RIDKER, P. M., FREI, B., HENNEKENS, C. H. & KRINSKY, N. I. Discrimination in absorption or transport of β -carotene isomers after oral supplementation with either all-trans or 9-cis- β -caroteno. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.61, p.1248-1252. 1995.

GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A. & SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, v.40, n.9, p.1107-1121. 2007.

GIBBS, B. F. E. A. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Science Nutritional*, v.50, p.213-224. 1999.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Science and Technology*, v.15, n.7-8, p.330-347. 2004.

MATIOLI, G. & RODRIGUES-AMAYA, D. B. Licopeno Encapsulado em Goma Arábica e Maltodextrina: Estudo da Estabilidade. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.5, p. 197-203. 2002.

GRATTARD, N., SALAUN, F., CHAMPION, D., ROUDAUT, G. & LE MESTE, M. Influence of physical state and molecular mobility of freeze-dried maltodextrin matrices on the oxidation rate of encapsulated lipids. *Journal of Food Science*, v. 67, n. 8, p. 3002-3010, 2002.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. The chemistry of free radical and, related "reactive species". In: *Free Radical in Biology and Medicine*. Oxford: Clarenton Press. 1999. 104 p.

HALSEY, G. Physical desorption on non-uniform surfcres. *Journal of Chemistry and Physics*, v.16, p. 931-937. 1948.

HANASHIRO, I., TAGAWA, M., SHIBAHARA, S., IWATA, K. & TAKEDA, Y. Examination of molar-based distribution of A, B and C chains of amylopectin by fluorescent labeling with 2-aminopyridine. *Carbohydrate Research*, v.337, n.13, p.1211-1215. 2002.

HANSEN, L. T., WONJTAS, A. P. M., JIW, Y. L. & PAULSON, A. T. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp*. In: milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 35-45, 2002

HENDERSON, S.M. A basic concept of equilibrium moisture. *Agricultural Enginnering*, v.33, p.29-32. 1952.

HENRIQUES, N. M., NAVALHO, J. C., VARELA, J. C. & CANCELA, M. L. Dunaliella: uma fonte natural de beta-caroteno com potencialidades de aproveitamento biotecnológico. *Boletim de Biotecnologia*, v.61, p.12-18. 1998.

HENRY, L. K., CATIGNANI, G. L. & SCHWARTZ, S. J. Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9-cis and all-trans b-carotene. *JAOCs*, v.75, n.7, p.823-829. 1998.

HIGUERA-CIAPARA, I., FELIX-VALENZUELA, L., F.M. GOYCOOLEA, F. M. & ARGÜELLES-MONAL, W. Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydrate Polymers*, v.56, p.41-45. 2004.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers*, v.45, n.3, p.253-267, 2001.

HOSSAIN, M. D., BALA, B.K., HOSSAIN, M. A. & MONDOL, M. R. A. Sorption isotherms and heat of sorption of pineapple. *Journal of Food Engineering*. v. 48, n. 2, p. 103-107. 2001

IMESON, A. P., LEDWARD, D. A. & MITCHELL, J. R. On the nature of the interaction between some anionic polysaccharides and proteins. *Journal Science of Food Agricultural*, v.28, p.661-667, 1997.

INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS (IPEF). 2003. Disponível em <http://www.ipef.br/identificacao/araucaria.angustifolia.asp>. Acesso em 30/03/2010.

JACKSON, L. S. & LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. *LWT - Food Science and Technology*, v.24, n.4, p.289-297. 1991.

JAYAKODY, L. & HOOVER, R. The effect of lintnerization on cereal starch granules. *Food Research International*, v.35, n.7, p. 665-680, 2002.

JUSZCZAK, L., FORTUNA, T. & KROK, F. Non-contact atomic force microscopy of starch granules surface: Part I. Potato and Tapioca starches. *Starch/Stärke*, v.55, n.1, p 1-7, 2003.

KAILASAPATHY, K. & LAM, S. H. Application of encapsulated enzymes to accelerate cheese ripening. *International Dairy Journal*, Oxford, v. 15, n. 6-9, p. 929-939, 2005.

KANDLAKUNTA, B., RAJENDRAN, A. & THINGNGANING, L. Carotene content of some common (cereals, pulses, vegetables, spices and condiments) and unconventional sources of plant origin. *Food Chemistry*, v.106, n.1, p.85-89. 2008.

KARATHANOS, V. T., MOURTZINOS, I., YANNAKOPOULOU, K. & ANDRIKOPOULOS, N. K. Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, Oxford, v. 101, n. 2, p. 652-658, 2007

- KAPUSNIAK, J. & TOMASIK, P. Lipid microencapsulation in starch. *Journal of Microencapsulation*, v. 23, n. 3, p. 341-348, 2006.
- KASAPIS, S. & SABLANI, S.S. A fundamental approach for the estimation of the mechanical glass transition temperature in gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.36, p. 71–78, 2005
- KAUSHIK, V. & ROOS, Y.H. Limonene encapsulation in freeze-drying of gum arabic-sucrose-gelatin systems. *LWT – Food Science and Technology*, v.40, n.8, p.1381-1391.
- KAYMAK-ERTEKIN, F. & GEDIK, A. Sorption isotherms and isosteric heat of sorption for grapes, apricots, apples and potatoes. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v.37, n.4, p.429–438, 2004.
- KENYON, M. M. & ANDERSON, J. Maltodextrins and low dextrose-equivalence corn syrup solids. In: Risch, S. J.; Reineccius, G. A. (Eds.) Flavor encapsulation, *American Chemical Society*, Washington, p. 87 – 102, 1988.
- KOCH, Z. & CORRÊA, M. C. Araucária: a Floresta do Brasil Meridional. Curitiba: Olhar Brasileiro. 2002. 148 p.
- KOSARAJU, S. L. Colon Targeted Delivery Systems: Review of Polysaccharides for Encapsulation and Delivery. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.45, n.4, p.251 - 258. 2005.
- KRINSKY, N. I., RUSSETT, M. D., HANDELMAN, G. J. & SNODDERLY, D. M. Structural and geometrical isomers of carotenoids in human plasma. *Journal of Nutrition*, v.120, p.1654–1662. 1990.
- KRINSKY, N. I. & YEUM, K.J. Carotenoid-radical interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 305, p.754–760, 2003.
- KRISHNAN, S., BHOSALE, R. & SINGHAL, R. S. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydrate Polymers*, v.61, p.95-102. 2005.
- KRISTAL, A. R. Vitamin A, Retinoids and Carotenoids as Chemopreventive. Agents for Prostate Cancer. *The Journal of Urology*, v.171, n.2, p.54-58. 2004.
- KUMAR, A. & SINGH, H. Recent advances in Microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, v.18, p.240-251. 2007.
- LABUZA, T. P. Shelf life dating of foods. Food & Nutrition Press Inc. Westport, 1982.
- LEITE, J. T. C. Transições de fases em alimentos: influência no processamento e na armazenagem. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.7, n.1, p.83-96. 2005.
- LEME, J., FONSECA, H. F. & NOGUEIRA, J.N. Variação do teor de ácido ascórbico e β -caroteno em cereja das Antilhas (*Malpighia punicifolia* L.) liofilizadas. *Archivos Latino Americanos de Nutrition*, v.23, n.2, p.207-215, 1973

- LESSIN, W. J., CATIGANI, G. L. & SCHWARTZ, S. J. Quantification of cis-trans isomers of provitamin A carotenoids in fresh and processed fruits and vegetables. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v.45, p.3728–3732. 1997.
- LIM, J. W. M., S.H.; SHIN, M. Action of α -amilase and acid on resistant starches prepared from normal maize starch. *Food Science and Biotechnology*, v.14, p. 32-38, 2004
- LIU, P., YU, L. & LIU, H. Transition temperature of starch studied by a high-speed DSC *Carbohydrate Polymers*, v.77, p. 250–253, 2005.
- LIU, H., YU, L., XIE, F., & CHEN, L. Gelatinization of corn starch with different amylose/amylopectin content. *Carbohydrate Polymers*, v.65, p.357-363. 2006.
- LOBO, A. R. & SILVA, G. M. D. L. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. *Revista de Nutrição*, v.16, p.219-226. 2003.
- LOKSUWAN, J. Characteristics of microencapsulated [beta]-carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, v.21, n.5-6, p.928-935. 2007.
- LOMAURO, C.J., BAKSHI, A.S. & LABUZA, T.P. Evaluation of food moisture sorption isotherm equations. Part I: Fruit, vegetable and meat products. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, v.18, p.111-117.1985.
- MADENE, A. M., J., SCHER, J. & DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, v.41, n.1, p.1-21. 2006.
- MADZIVA, H., KAILASAPATHY, K. & PHILLIPS, M. Alginate-pectin microcapsules as a potential for folic acid delivery in foods. *Journal of Microencapsulation*, v. 22, n. 4, p. 343-351, 2005.
- MAN, Y.B.C., IRWANDI, J. & ABDULLAH, W.J.W. Effect of different types of maltodextrin and drying methods on physico-chemical and sensory properties of encapsulated durian flavour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.79, n.8, p.1075-1080.
- MARANGONI, A. G. Enzyme Kinetics: A Modern Approach. John Wiley & Sons. 2003
- MARCON, M. J. A., Avancini, S.R.P. & AMANTE, E.R. Propriedades químicas e tecnológicas do amido de mandioca e do polvilho azedo, UFSC, Florianópolis, 2007. 101 p.
- MARQUES, L. G., SILVEIRA, A.M. & FREIRE, J. T. Freeze-drying characteristics of tropical fruits. *Drying Technology*, v.24, p-457-463, 2006.

- MARTINS, B. T. Tecnologia de secagem preservam as características dos alimentos. *Revista Engenharia de Alimentos*, v.6, n.30, p.40-42. 2000.
- MARX, M., STUPARIC, M., SCIEBER, A. & CARLE, R. Effects of thermal processing on trans–cis-isomerization of β -carotene in carrot juices and carotene-containing preparations. *Food Chemistry*, v.83, p. 609–617, 2003
- MATHLOUTHI, M. & ROGÉ, B. Water vapour sorption isotherms and the caking of food powders. *Food Chemistry*, 82, 61-71. 2003.
- MATIOLI, G. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Licopeno Encapsulado em Goma Arábica e Maltodextrina: Estudo da Estabilidade. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.5, p.197-203. 2002.
- MATIOLI, G. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, p.102-105, 2003.
- MATSUMOTO, M. & KONDO, K. Enhanced thermostability of α -chymotrypsin enclosed in inorganic microcapsules. *Journal of Bioscience and Bionginering*, v.92, n.2, p.197-199. 2001.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J. BRITTON G., VICARIO, I. & HEREDIA, F. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments *Food Chemistry*, v.101, p.1145–1150. 2007.
- MENDEZ FILHO, J. D. & RODRÍGUEZ, H.G.R. Sobre los beneficios de los radicales libres. *Revista Médica*, v.4, p.309-313. 1997.
- MESTRES, C. Los estados físicos del almidon. In.: Conferencia Internacional sobre almidón: propiedades físico-químicas, funcionale, y nutricionales. Quito: Instituto de Investigacion Technologica de la Escuela Politecnica Nacional, p.1-10, 1996.
- MINOLTA. Precise color communication: color control from feeling to instrumentation. Japão: Minolta Corporation. 49p.,1994.
- MUN, S.H. & SHIN, M. Mild hydrolysis of resistant starch from maize. *Food Chemistry*, v. 96, n.1, p.115-121, 2006.
- MURRAY, D. G. & LUFT, L. R. Low-DE corn starch hydrolysis. *Food Technology*, v. 27, n. 3, p. 32-40, 1973.
- MURÚA-PAGOLA, B., BERISTAIN-GUEVARA, C. I. & MARTÍNEZ-BUSTOS, F. Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering*, v.91, n.3, p.380-386. 2009.
- NACHTIGAL, A. M., SILVA, A. G., STRINGHETA, P.C., SILVA, P.I. & BERTOLDI, M.C. Correlação entre métodos espectrofotométricos e calorimétricos na determinação da foto e termossensibilidade dos carotenóides de tomate. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v. 27, n.1, p. 11-18, 2009.

- NOBEL, A. C. Investigation of the color changes in heat concentrated tomato pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.23, n.1, p.45-46, 1975
- NORI, M. A. Ingredientes e aditivos microencapsulados na indústria de alimentos. *Revista Engenharia de Alimentos*, n.6, p.33-35. 1996.
- OLIVER, J. & PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods *Journal of Chromatography*, v.881, n.1-2, p.543-555. 2000.
- ONWULATA, C.; SWITH, P. W.; CRAIG, J. C.; HOLSINGER, V. H. Physical properties of encapsulated spray-dried milk fat. *Journal of Food Science*, v. 59, n. 2, p. 316-320, 1994.
- ORDONEZ, J. A., CAMBERO, M.I.R., FERNANDEZ, L.A., SANZ, M.L.G., GARCIA DE FERNANDO, G.D., PERALES, L.H., CORTECER, M.D.S. *Tecnologia de Alimentos*. Porto Alegre: Artmed. 2005.
- OTHA, N. Colorimetry: fundamental and applications. Chichester: John Wiley & Sons, 334p, 2005.
- PALIPANE, K.B. & DRISCOLL, R.H. Moisture sorption characteristics of in shell macadamia nuts. *Journal of Food Engineering*, v.18, p. 63-76, 1992.
- PELEG, M. Assessment of a semi empirical four parameter general model for sigmoid moisture sorption isotherms. *Journal of Food Processing Engineering*, v.16, n.1, p. 21-37. 1993.
- PELEG, M. A model of survival curves having an activation shoulder. *Journal of Food Science*, v. 67, n.7, p.2438–2443, 2002.
- PELEG, M. Calculation of the non-isothermal inactivation patterns of microbes having sigmoidal isothermal semi-logarithmic survival curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.40, n.2, p.645–658. 2003.
- PENG, G., CHEN, X., WU, W. & JIANG, X. Modeling of water sorption isotherm for corn starch. *Journal of Food Engineering*, v.80, p.562–567, 2007.
- PORRARUD, S. & PRANEE, A. Microencapsulation of Zn-chlorophyll pigment from Pandan leaf by spray drying and its characteristic. *International Food Research Journal*, v.17, p.1031-1042, 2010.
- POTHAKAMURY, U. R. & BARBOSA-CANOVAS, G. V. Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science & Technology*, v.6, n.12, p.397-406. 1995.
- POTTER, N. N. & HOTCHKISS, J. H. *Food Science*. New York: Chapman e Hall. 1998. 608 p.

PRENTICE-HERNÁNDEZ, C & RUSIG, O. Efeito da luz na estabilidade de um extrato microencapsulado obtido a partir do urucum (*Bixa Orellana*, L.). *Brazilian Journal of Food Technology*, n.27, 1999.

QI, Z. H. & XU, A. Starch-based ingredients for flavor encapsulation. *Cereal Foods World*, v. 44, n. 7, p. 460 – 465, 1999.

QUIRÓS, A.R.B., COSTA, H. S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.19, n.2-3, p.97-111. 2006.

RADLEY, J. A. Industrial uses of starch and its derivatives. London: Applied science publishers Ltda. 1976. 276 p.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, v.16, p.1195-1236. 1998.

RIBEIRO, E. P. & SERAVALLI, E.A.G. *Química de los Alimentos*. São Paulo: Edgard Blücher. 2004

RIBEIRO, H. S., CHUA, B. C., ICHIKAWA, S. & NAKAJIMA, M. Preparation of nanodispersions containing β -carotene by solvent displacement method. *Food Hydrocolloids*, v.22, p.12-17. 2008.

REINECCIUS, G. A. The spray drying of food flavors. *Drying Technology*, v. 22, n. 6, p. 1289-1324, 2004.

RIGHETTO, A. M. & NETTO, F. M. Vitamin C stability in encapsulated green West Indian cherry juice and in encapsulated synthetic ascorbic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 86, n. 8, p. 1020-1208, 2006.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Changes in carotenoids during processing and storage of foods. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.49, p.38S-47S, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., KIMURA, M. & AMAYA-FARFAN, J. Fontes Brasileiras de Carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2008. 99 p.

ROOS, Y. H. Phase transitions in foods. San Diego, California: Academic Press. 1995.

ROSEMBERG, M., KOPELMAN, I.J. & TALMON, Y. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, p. 1288 – 1294, 1990.

SANTOS, A. B., FÁVARO-TRINDADE, C.S. & GROSSO, C.R.F. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n. 2, p. 322-326, 2005

SANTOS, A. B., FERREIRA, V. P. & GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: uma alternativa viável. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.3, n.16, p.26-30. 2001.

SANDHU, K.S., SINGH, N. & LIM, S.T. A comparison of native and acid thinned normal and waxy corn starches: Physicochemical, thermal, morphological and pasting properties. *LWT- Lebensmittel-Weissenschaft & Technology*, v.40, p.1527-1536.2007

SGARBIERI, V.C. Proteínas em Alimentos Protéicos. São Paulo: Varela, 1996.

SHAHIDI, F. & HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.33, n.6, p.501-547. 1993.

SHAIKH, J., BHOSALE, R. & SINGHAL, R. Microencapsulation of black pepper oleoresin. *Food Chemistry*, v. 94, n. 1, p. 105-110, 2006.

SHAMI, N. J. I. E. & MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. *Revista da Nutrição*, v.17, n.2, p. 227-236, 2004.

SHARIFFA, Y. N., KARIM, A.A., FAZILAH, A. & ZAIDUL, I.S.M. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. *Food Hydrocolloids*, v.23, n.2, p.434-440, 2009.

SHEU, T.Y. & ROSENBERGE, M. Microencapsulation by spray drying ethyl caprylate in whey protein and carbohydrate wall systems. *Journal of Food Science*, v.60, n.1, 98–103, 1995.

SHIVHARE, U.S., ARORA, S., AHMED, J. & RAGHAVAN, G.S.V. Moisture adsorption isotherms for mushroom. *LWT- Lebensmittel-Weissenschaft & Technology*, v.37, p.133-137, 2004

SHU, B., YU, W., ZHAO, Y. & LIU, X. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, v.76, p.664-669, 2006.

SINGH, J., KAUR, L. & MCCARTHY, O. J. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications-A review. *Food Hydrocolloids*, v.21, n.1, p.1-22, 2007.

SINGH, J. & N. SINGH. Studies on the morphological and rheological properties of granular cold water soluble corn and potato starches. *Food Hydrocolloids* v.17, n.1, p. 63-72, 2003.

SMITH, S.E. The sorption of water vapour by high polymers. *Journal of the American Chemical Society*, v.69, p.646, 1947.

SPARKS, R. E. Microencapsulation. In: Kirk-Othmer. *Encyclopedia of Chemical Technology*, New York: John Wiley & Sons. 470 p. 1981.

SPEISS, W. E. L. & WOLF, W. F. The results of the cost 90 project on water activity. *Physical properties of foods*, p.65-91, 1987.

STAHL, W., SCHWARZ, W., SUNDQUIST, A. R. & SIES, H. Cis-trans isomers of lycopene and b-carotene in human serum and tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.294, p.173-177, 1992.

STAHL, W., SCHWARZ, W., VON LAAR, J. & SIES, H. All-trans b-carotene preferentially accumulates in human chylomicrons and very low density lipoproteins compared with 9-cis geometrical isomer. *The Journal of Nutrition*, v.125, p.2128-2133, 1995.

STENCL, J. Modelling the water sorption isotherms of yoghurt Power spray. *Mathematics and Computers in Simulation*, v.65, p.157-164, 2004.

SUTTER, S. C., BUERA, M. P. & ELIZALDE, B. E. b-Carotene encapsulation in a mannitol matrix as affected by divalent cations and phosphate anion. *International Journal of Pharmaceutics*, v.332, p.45-54, 2006.

SWINKELS, J. J. M. Composition and properties of commercial native starches. *Starch/Starke*, v.37, p.1-5, 1985.

TESTER, R. F., KARKALAS, J. & QI, X. Starch--composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, v.39, n.2, p.151-165, 2004.

TESTER, R.T. & MORRISON, W.R. Swelling and gelatinization of cereal starches I.Effect of amylopectin, amylose, and lipids. *Cereal Chemistry*, v.67, n. 6, p.551-557, 1990.

THIES, C. How to make microcapsules. Sant Louis: Lecture and Laboratory Manual. 1995

THIAGU, R., ONWUZULU, O.C. & RAMANA, K.V.R. A non-destructive measurement of pigments of whole tomato by reflectance technique. *Journal of Food Science and Technology*, v.30, n.2, p. 92-96, 1993.

THYS, R. C. S.; NORENA, C. P. Z.; MARCZAK, L. D. F. ; SILVEIRA, N. P. ; WESFAHL JUNIOR, H. & CARDOSO, M. B. Effect of the alkaline treatment on the ultrastructure of C-type starch granules. *Biomacromolecules*, v. 9, p. 1894-1901, 2008.

THYS, R. C. S. Caracterização e avaliação de amido nativo e modificado de pinhão mediante provas funcionais e térmicas. Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

THYS, R. C. S.; NORENA, C. P. Z.; MARCZAK, L. D. F., AIRES, A. G.; CLADERA-OLIVERA, F. Adsorption isotherms of pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch and thermodynamic analysis. *Journal of Food Engineering*, v. 100, n.3, p. 468 - 473, 2010.

THOMAS, D. J. & ATWELL, W. A. Practical Guide for Food Industry. Starches. Minnesota: Eagan Press, 30p. 1999.

TOBITSUKA, K., MIURA, M. & KOBAYASHI, S. Retention of a European pear aroma model mixture using different types of saccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 14, p. 5069-5076, 2006.

TROLLER, J. Water activity measurements with a capacitance manometer. *Journal of Food Science*, v.48, n.3, p.739-741, 1983.

TRUJILLO, F. J., YEOW, P. C., & PHAM, Q. T. Moisture sorption isotherm of freshlean beef and external beef fat. *Journal of Food Engineering*, v.60, p.357-367, 2003.

VAIDYA, S., BHOSALE, R. & SINGHAL, R. Microencapsulation of cinnamon oleoresin by spray drying using different wall materials. *Drying Technology*, v. 24, n. 8, p. 983-992, 2006.

VAN DEN BERG, C. Development of B.E.T like models for sorption of water of foods, theory and relevance. In D. Simatos & J.L. Multon (Eds). *Properties of water in foods* (p. 119-135). Martinus Nijhoff, Dordrecht. 1985.

VAN DE BIJ, J. The analysis of starch derivatives. Examination and analysis of starch. London: Applied Science Publisher. 1976

VIEIRA, M. & HO, P. Experiments in unit operations and processing of foods. New York: Springer. 190 p, 2008.

VOS, P., FAAS, M.M., SPASOJEVIC, M. & SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, v.20, n.4, p.292-302, 2010.

WAGNER, L. A. & WARTHESEN, J. J. Stability of spray dried encapsulated carrot carotenes. *Journal of Food Science*, v.60, n.5, p.1048-1053, 1995.

WEGMULLER, R., ZIMMERMANN, M. B., BUHR, V. G., WINDHAB, E. J. & HURREL, R. Development, stability, and sensory testing of microcapsules containing iron, iodine and vitamin A for use in food fortification. *Journal of Food Science*, v. 71, n. 2, p. 181-187, 2006.

WEIBULL, W. A statistical distribution of wide applicability. *Journal of Applied Mechanics*, v.18, p.293-297, 1951.

WESTGATE, P., LEE, J.Y. & LADISCH, M.R. Modeling of equilibrium sorption of water vapour on starch materials. *American Society of Agricultural Engineers*, v.35, p.213-219, 1992.

WENDLANT, W. W. Thermal analysis. New York: John Wiley & Sons, 1986.

WHISTLER, R. L. & DANIEL, J.R. Molecular structure of starch. *Starch: chemistry and technology*. New York: Academic Press, p. 153-182, 1984.

- WHORTON, C. & REINECCIUS, G.A. Eds., American Chemical Society, Washington, Dc, P 143-160, 1995. Evaluation of the mechanisms associated with the release of encapsulated flavor materials from maltodextrina matrices. *Encapsulation and Controlled Released of Food Ingredients*, p.143-160, 1995.
- WONG, D. W. S. Química de los Alimentos: Mecanismos y Teoria. Zaragoza: Acribia. 476 p, 1995.
- WOSIACKI, G. & CEREDA, M. P. Characterization of pinhao starch. Part I: Extration and properties of pinhao starch. *Starch/Starke*, v.37, p.224-227, 1984.
- YANNIOTIS, S. & BLAHOVEC, J. Model Analysis of Sorption Isotherms. *LWT-Food Science and Technology*, 42, p.1688-1695, 2009.
- YOSHII, H., SCOTITANTAWAT, A., LIU, S.D., ATARASHI, T., FURUTA, T., AISHIMA, S., OHGAWARA, M. & LINKO, P. Flavor release from spray-dried maltodextrin/gum arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.2, n.1, p.55-61, 2001
- YONEMOTO, P. G. Efeito do tamanho dos grânulos nas características estruturais e físico-químicas do amido de trigo. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, Brasil, 2006.
- YOUNG, J.F. Humidity control in the laboratory using salt solutions- a review. *Journal of Applied Chemistry*, v.17, p.241-245, 1976
- YOUNG, A. J. & LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 385, n. 1, p. 20-27, 2001
- YOSHII, H., SCOTITANTAWAT, A., LIU, S.D., ATARASHI, T., FURUTA, T., AISHIMA, S., OHGAWARA, M. & LINKO, P. Flavor release from spray-dried maltodextrin/gum arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.2, n.1, p.55-61, 2001.
- ZAMBRANO, F. M. & CAMARGO, C. R. O. Otimização das Condições de Hidrólise Ácida de Amido de Mandioca para Obtenção de Substituto de Gordura. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.4, p.147-154, 2001.
- ZAMBRANO, F. M. & CAMARGO, C. R. O. Substitutos de Gordura: Efeito da Concentração de Ácido e do Tempo de Hidrólise do Amido de Mandioca em Algumas Características dos Hidrolisados. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.2, p.155-159, 1999.
- ZEPKA, L. Q. & MERCADANTE, A. Z. Degradation compounds of carotenoids formed during heating of a simulated cashew apple juice. *Food Chemistry*, v.117, p.28-34, 2009.
- ZOBEL, H.F. Starch crystal transformations and their industrial importance. *Starch-Starke*, v.40, n.1, p. 1-7, 1988.

Apêndice A

Solubilidade dos sais utilizados para construir as isotermas de sorção

A Figura A.1 apresenta a solubilidade em água dos sais utilizados para obtenção das isotermas de sorção, em diferentes temperaturas.

Figura A 1. Solubilidade dos sais utilizados para determinar as isotermas de adsorção das microcápsulas de amido de pinhão, em diferentes temperaturas.

Sais\Temperatura	Solubilidade (g. 100 ml de H ₂ O ⁻¹)		
	10°C	20°C	30°C
LiCl	73,79	83,5	86,2
CH ₃ COOK	233	256	283
MgCl ₂	52,32	54,6	55,8
K ₂ CO ₃	107,03	111	114
NaNO ₂	76,67	80,8	87,6
NaCl	35,72	35,9	36,1
KCl	30,90	34,2	37,2
BaCl ₂	33,12	35,8	38,1
CuSO ₄	16,82	20,04	23,91

Fonte: Lide (1996)

Apêndice B

Curva padrão para conversão da absorbância em equivalente de dextrose (mg de glicose. mL de solução⁻¹)

A Figura B.1 representa a curva padrão para conversão da absorbância (nm) em DE (mg de glicose. mL de solução⁻¹) para amostras com DE < 1. E a Figura B.2 é utilizada quando as amostras apresentam DE > 1.

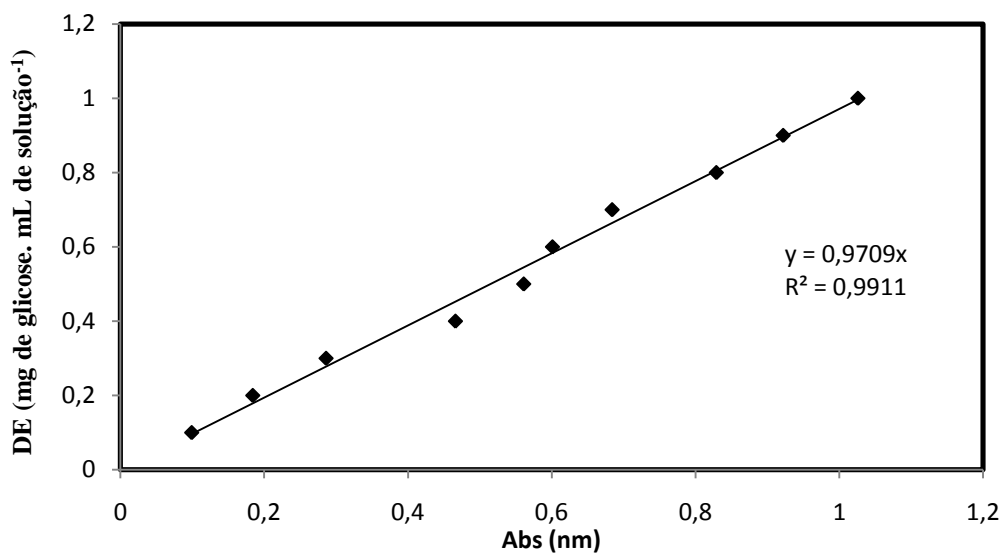


Figura B 1. Curva padrão para conversão da absorbância em DE (mg de glicose. mL de solução⁻¹) para amostras com DE < 1.

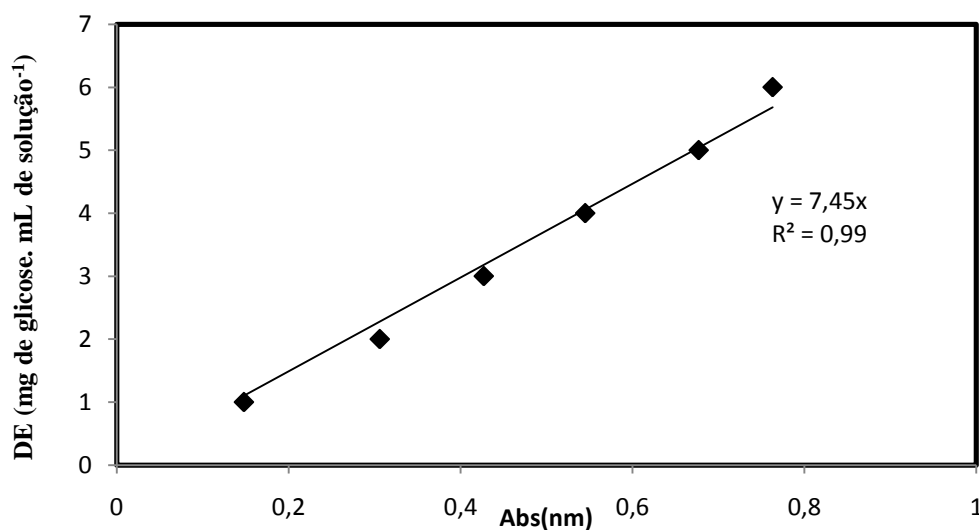


Figura B 2. Curva padrão para conversão da absorbância em DE (mg de glicose. mL de solução⁻¹) para amostras com DE > 1.

Apêndice C

Espectro de varredura de β -caroteno em hexano.

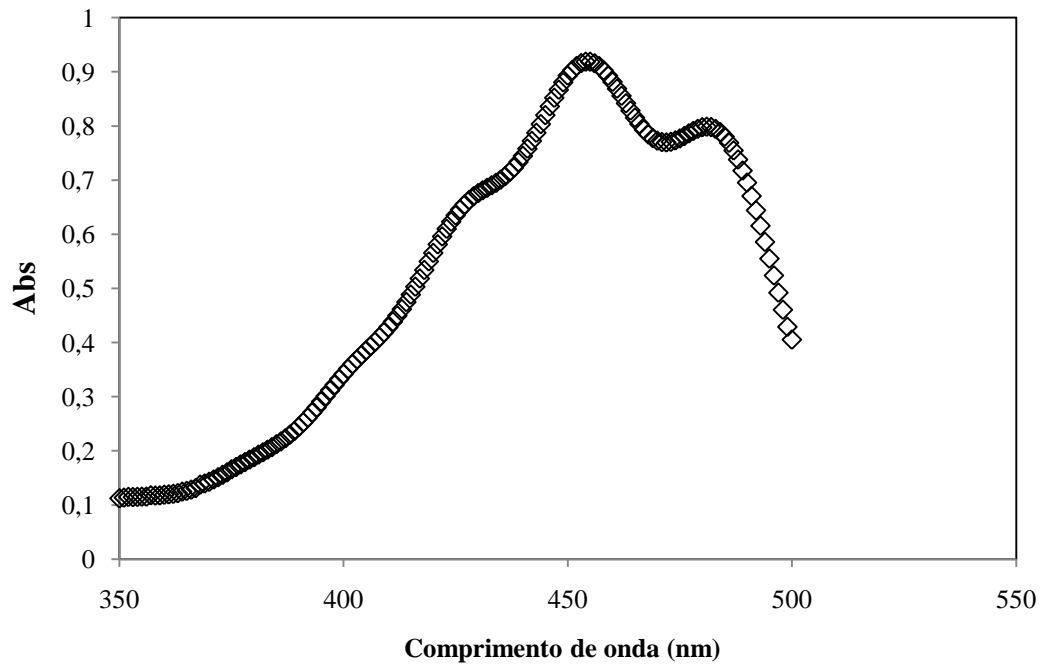


Figura C 1. Espectro de varredura de β -caroteno puro em hexano.

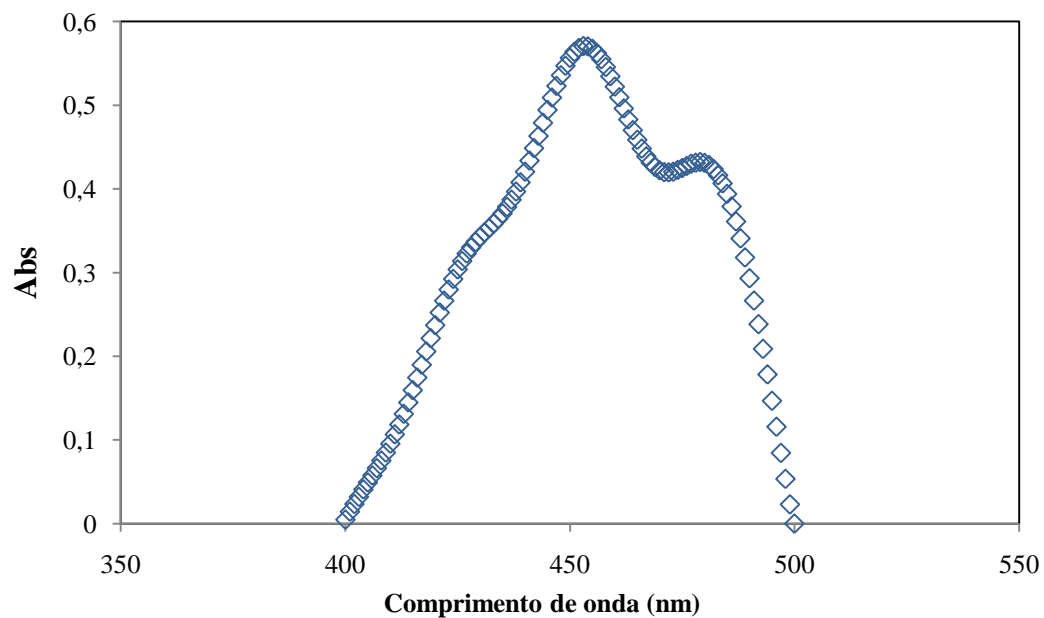


Figura C 2. Espectro de varredura de β -caroteno extraído da cápsula preparada com amido hidrolisado após 15 dias, em hexano.

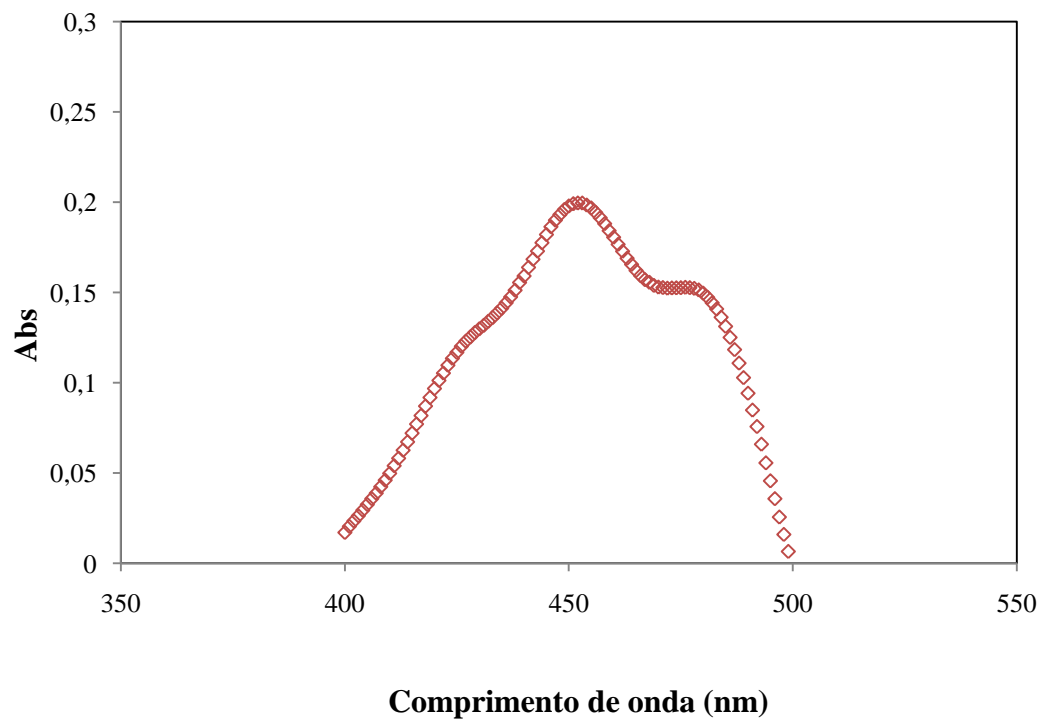


Figura C 3. Espectro de varredura de β -caroteno extraído da cápsula preparada com amido nativo após 15 dias, em hexano.

Apêndice D

Curva padrão para determinação da concentração de β -caroteno (ppm)

A Figura D.1 apresenta a curva padrão para conversão da absorbância (nm) em ppm de β -caroteno, utilizando hexano como solventes de extração. Para plotar estas curvas utilizou-se a média de três repetições.

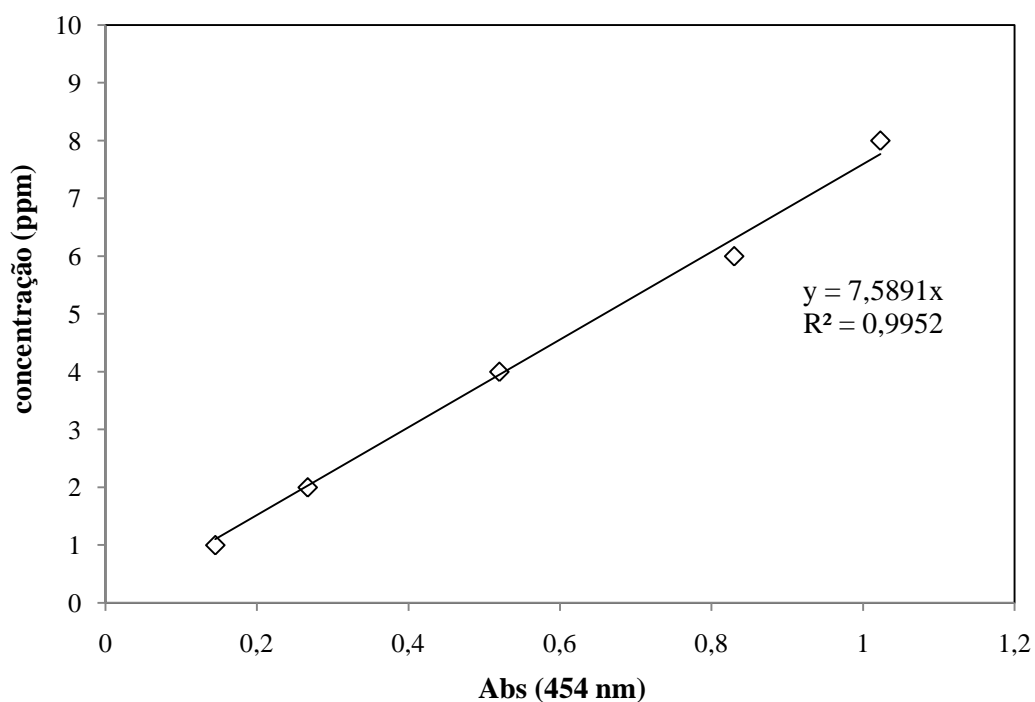


Figura D 1. Curva padrão para conversão da absorbância (454 nm) em ppm de β -caroteno, usando hexano como solvente de extração e quantificação.

Apêndice E

Histogramas da distribuição do tamanho de partícula

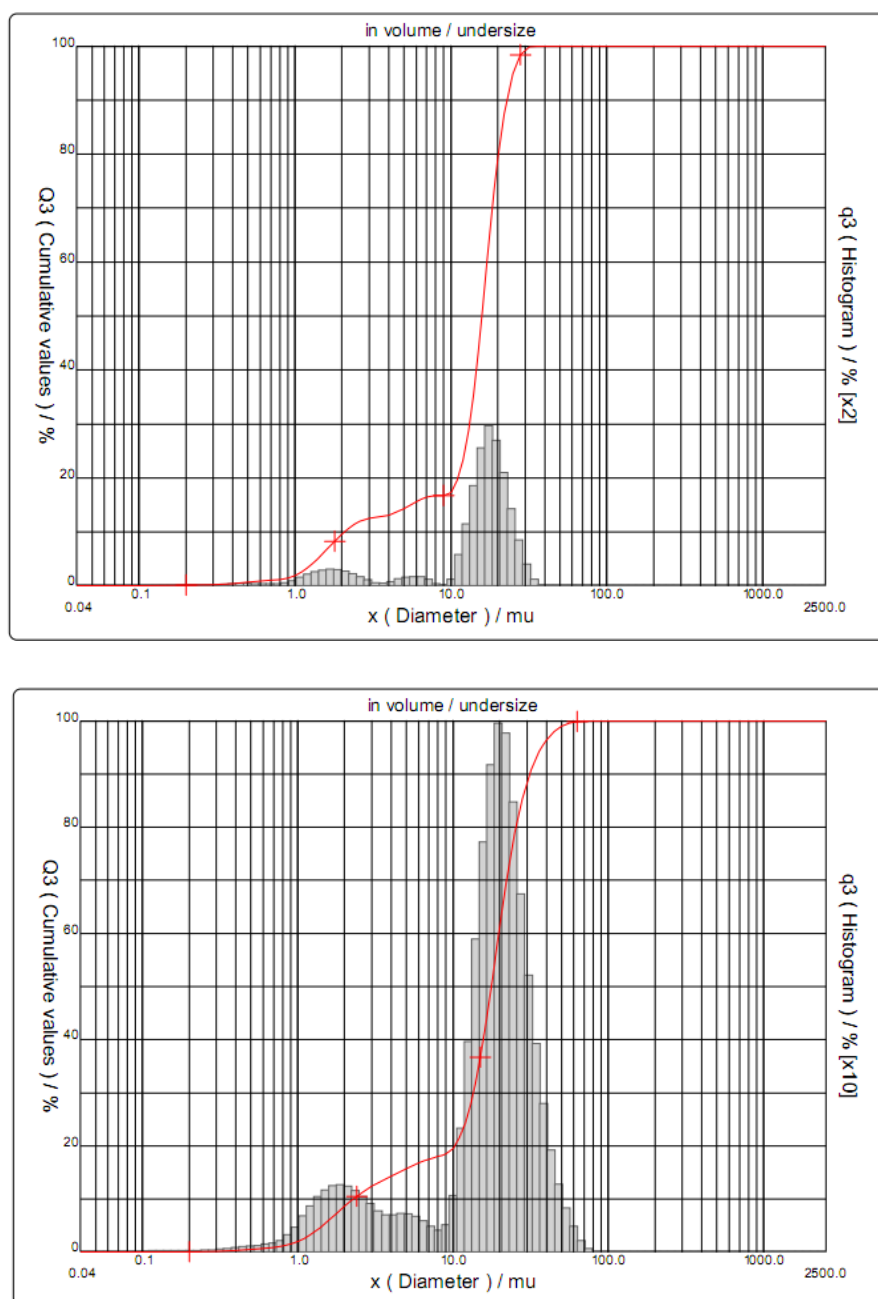


Figura E 1 Distribuição granulométrica do amido de pinhão nativo e hidrolisado.

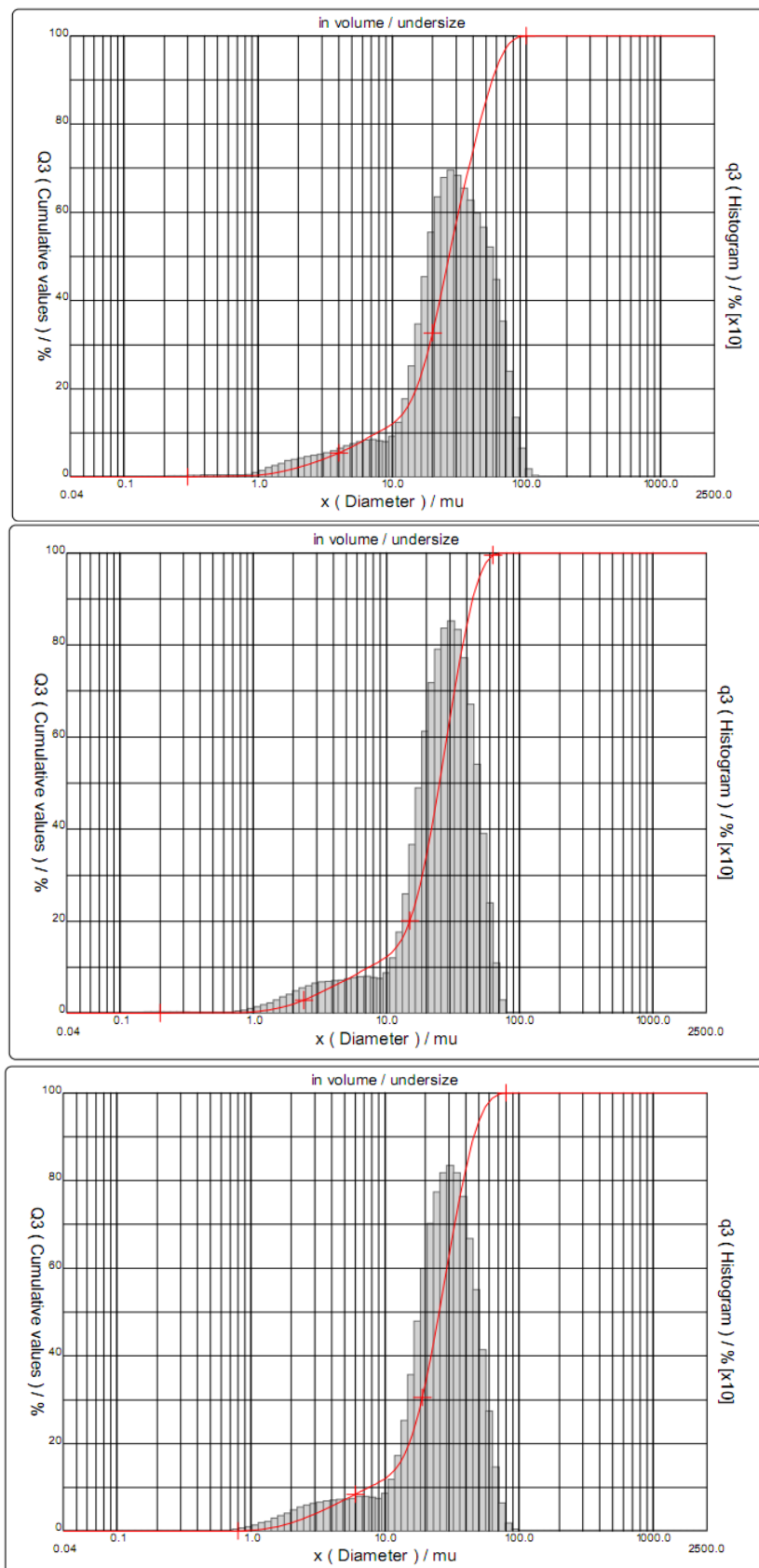


Figura E 2. Distribuição granulométrica das cápsulas liofilizadas preparadas com amido nativo (A), hidrolisado 6 DE (B) e hidrolisado 12 DE (C) com gelatina.

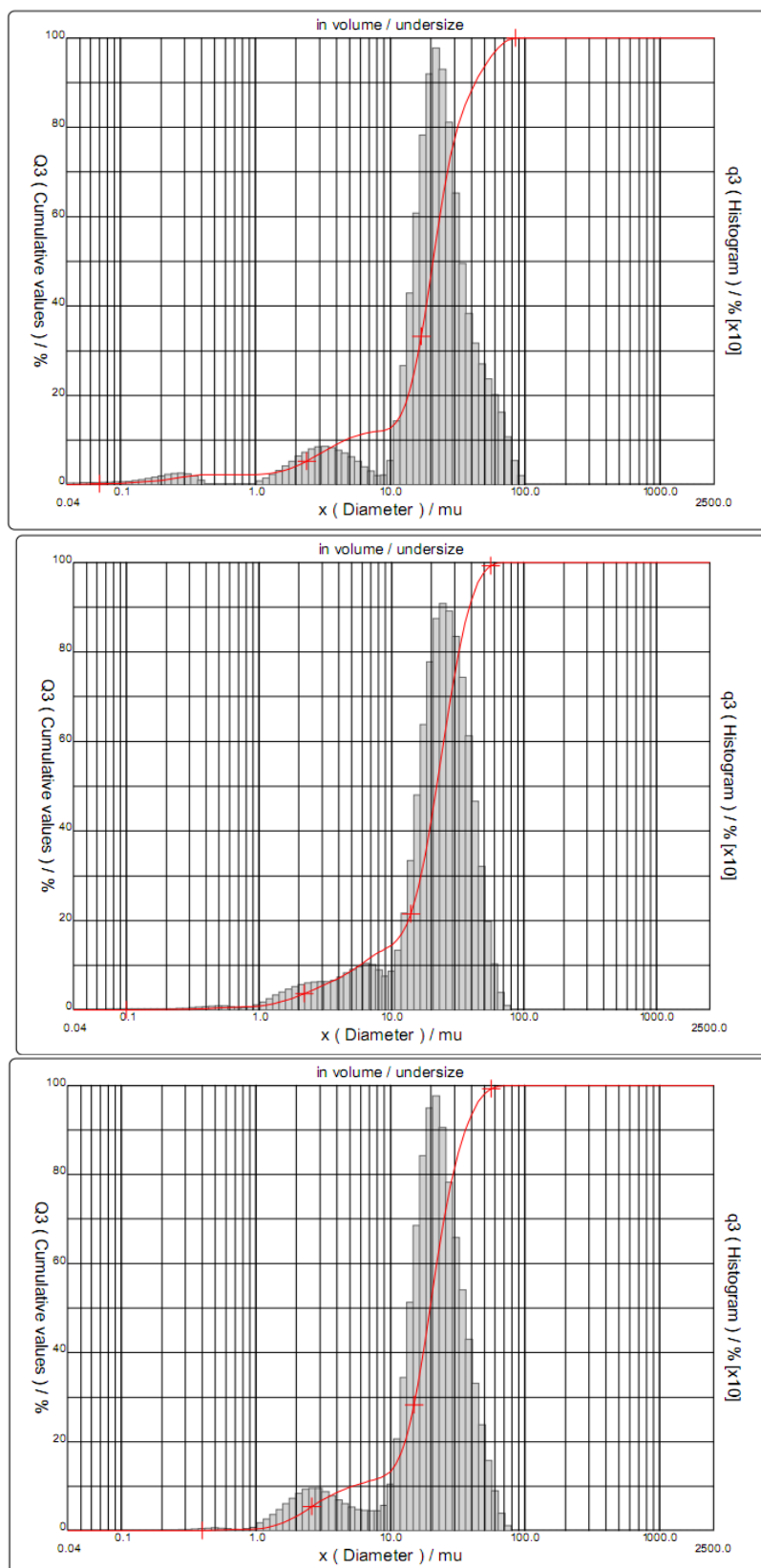


Figura E 3. Distribuição granulométrica das cápsulas liofilizadas preparadas com amido nativo (A), hidrolisado 6 DE (B) e hidrolisado 12 DE (C).

Apêndice F

As Figuras abaixo apresentam o comportamento do β -caroteno encapsulado nos diferentes materiais de parede nas diferentes condições de estocagem testadas.

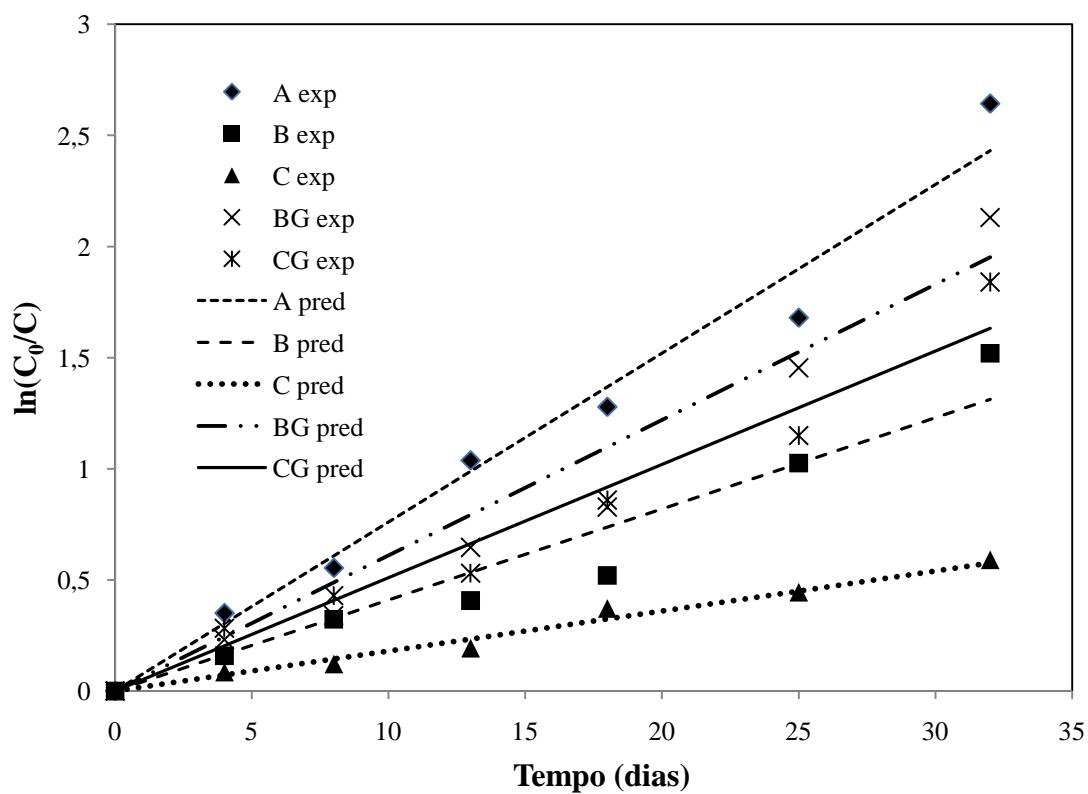


Figura F 1. Valores experimentais e preditos por um modelo cinético de primeira ordem para o β -caroteno encapsulado e estocado a 30°C em condições aeróbias.

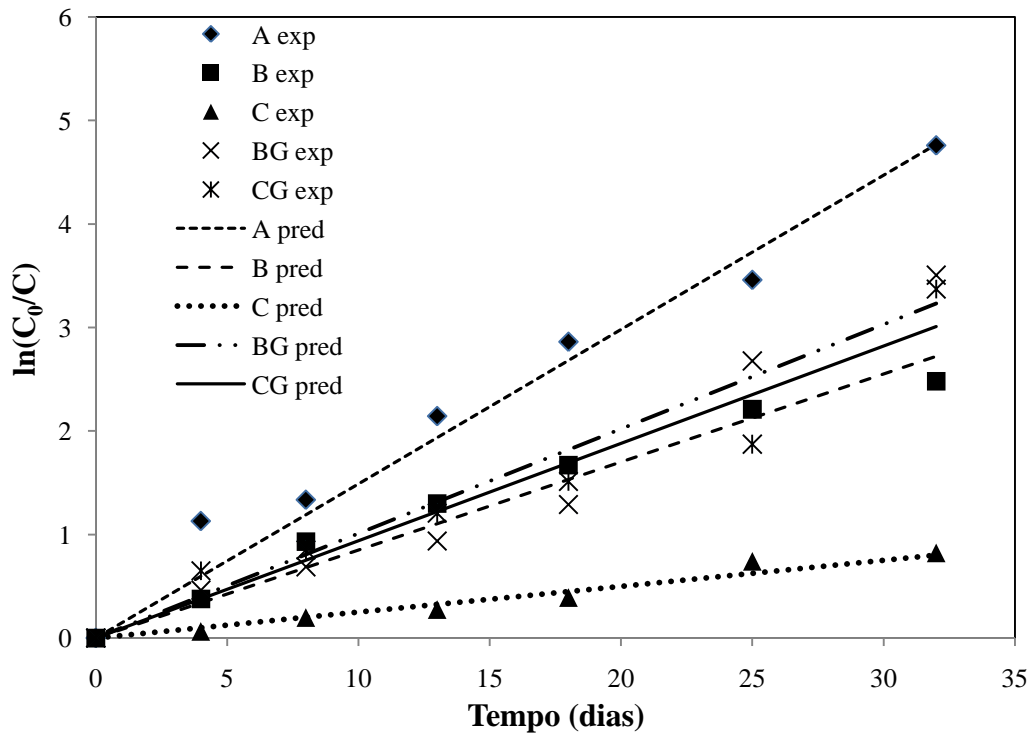


Figura F 2. Valores experimentais e preditos por um modelo cinético de primeira ordem para o β-caroteno encapsulado e estocado a luz em condições aeróbias.

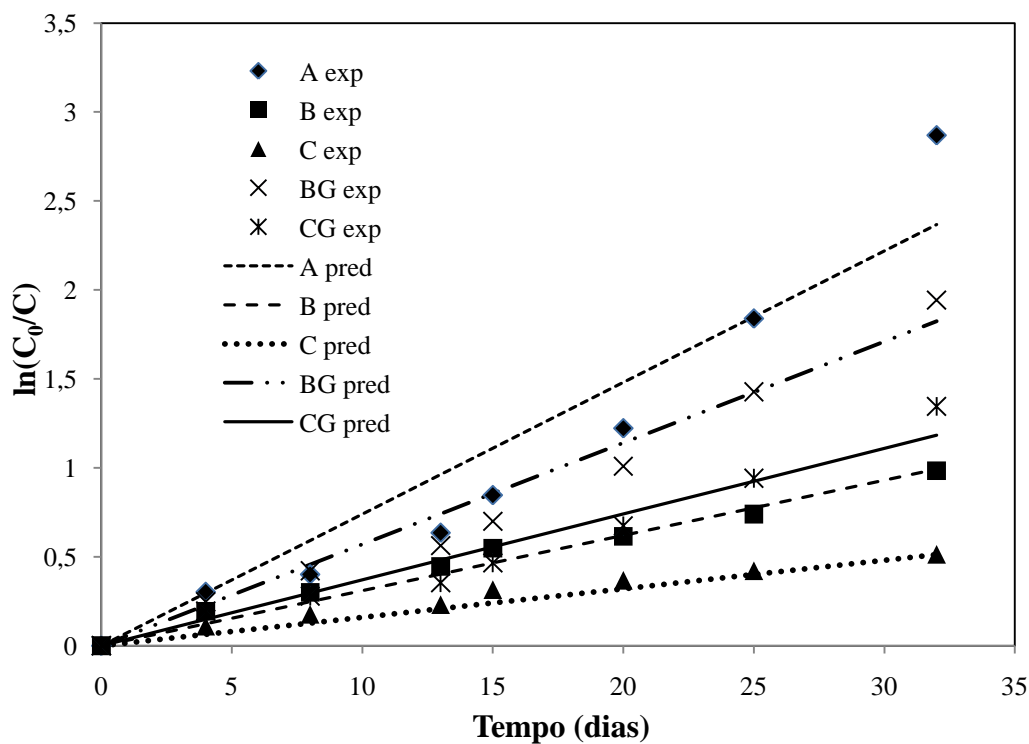


Figura F 3. Valores experimentais e preditos por um modelo cinético de primeira ordem para o β-caroteno encapsulado e estocado no escuro em condições aeróbias.

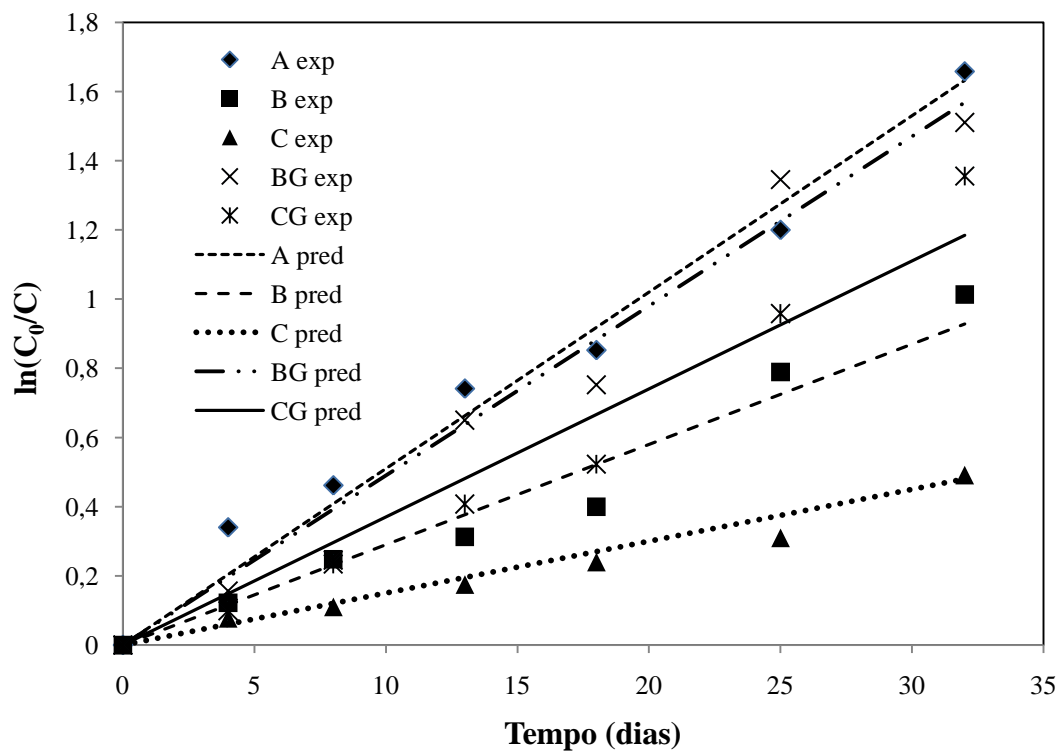


Figura F 4. Valores experimentais e preditos por um modelo cinético de primeira ordem para o β-caroteno encapsulado e estocado a 30°C em condições anaeróbias.

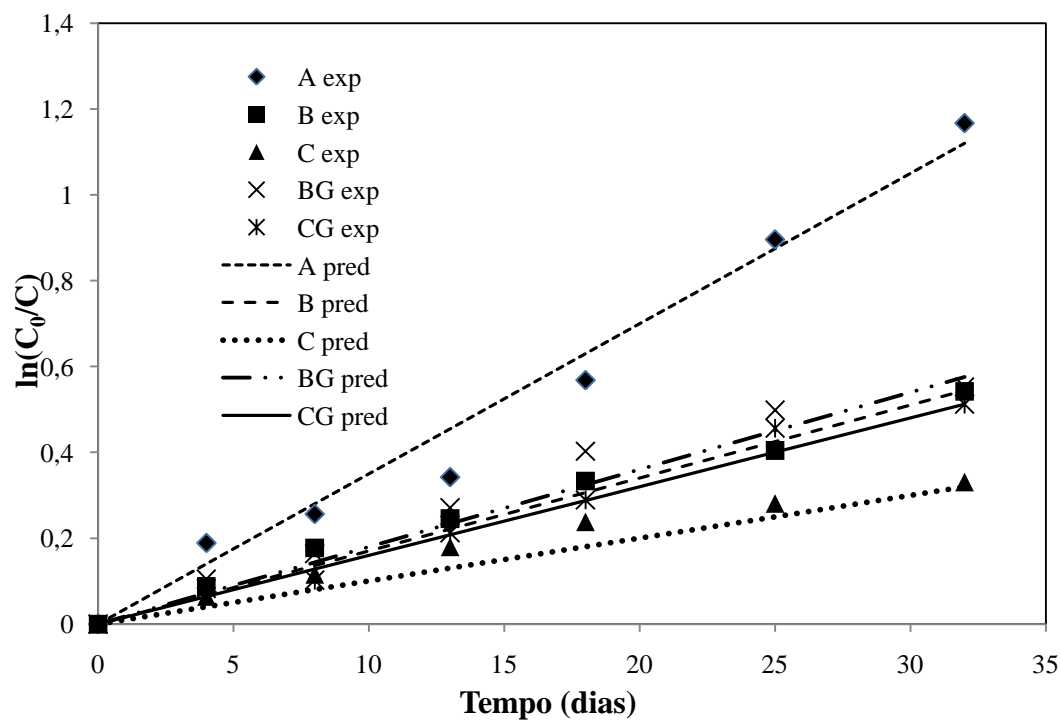


Figura F 5. Valores experimentais e preditos por um modelo cinético de primeira ordem para o β-caroteno encapsulado e estocado a 10°C em condições anaeróbias.

Apêndice G

Fotografias das amostras após 20 dias em diferentes condições de estocagem

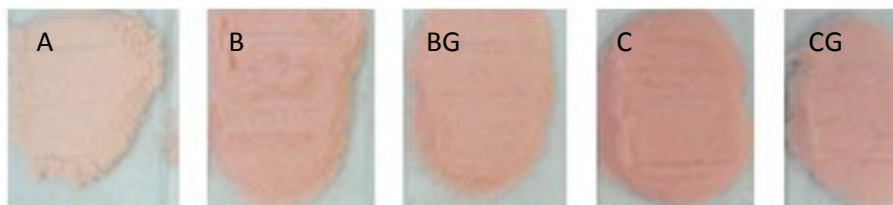


Figura G 1. Coloração das cápsulas estocadas à 10°C em condições aeróbias.

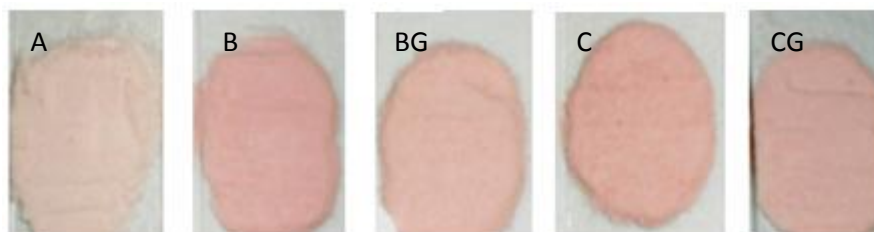


Figura G 2. Coloração das cápsulas estocadas à temperatura ambiente em condições aeróbias.

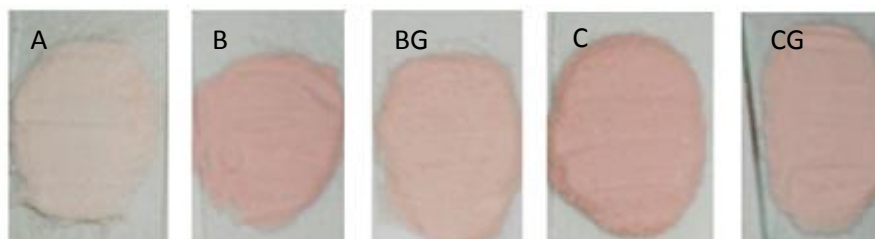


Figura G 3. Coloração das cápsulas estocadas à 30°C em condições aeróbias.

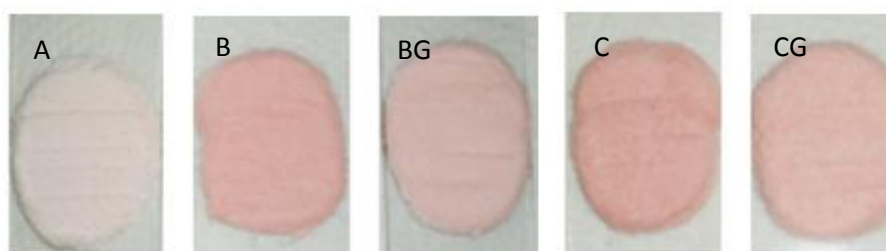


Figura G 4. Coloração das cápsulas expostas à luz UV em condições aeróbias.